

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LA MYOCARDITE DE LA POLIOMYÉLITE

par LARUELLE et REUMONT.

*(Travail du Laboratoire de Recherches
de l'Institut Neurologique Belge.)*

Le problème de la Myocardite de la Poliomyélite reste un problème ouvert pour le bactériologue, le clinicien et l'anatomiste : nous apportons ici la contribution de l'histopathologiste.

Nos recherches ressortissent à la poliomyélite expérimentale ; elles ont utilisé un matériel de cœurs de souris blanches.

Les objectifs de ce travail ont été assignés comme suit :

1° Détecter des lésions du myocarde sur des cœurs de « souris neuves », c'est-à-dire d'animaux non inoculés.

2° Relever les lésions myocardiques des cœurs de souris inoculées de souches de virus différents.

3° Etablir la fréquence des lésions dans ces deux lots de souris.

4° Faire l'analyse histologique des lésions, en reconnaître les caractéristiques inflammatoires ou destructives, en établir le degré de gravité, confronter, pour en faire la comparaison, les aspects histopathologiques observés chez les « souris neuves » et chez les souris inoculées.

5° Objectiver les lésions par des microphotographies donnant des images d'ensemble et, à des grossissements plus forts, les figures des différents éléments cellulaires constitutifs.

Les conditions indispensables à ce travail ont été remplies et, en particulier, les précautions rigoureuses concernant l'origine

et l'élevage des souris devant servir de tests normaux, ont été prises.

A titre de contrôle, on ne s'est pas limité aux animaux de notre élevage, mais on a eu recours à des souris d'origine, de pays et d'élevages différents.

Les animaux d'expérience avaient tous les indices d'un excellent état physique, étaient en bonne vitalité et d'un comportement normal. Le poids des souris neuves a varié de 13 à 18 g.

Les souris ont été inoculées par voie intracérébrale et intrapéritonéale par les souches suivantes dont nous indiquons en même temps l'origine. Elles ont présenté des symptômes caractéristiques de la maladie et ont été sacrifiées à des stades différents de l'évolution.

Souche Lansing : Institut Pasteur de Paris (Pr P. Lépine).

Souche M. M. : Institut Pasteur de Paris (Pr P. Lépine).

Souche Columbia S. K. : Pr C. Jungeblut (New-York).

Souche Theiler.

Souche Coxsackie : Pr Dalldorf (New-York).

Ornithose : Institut Pasteur de Paris (Pr P. Lépine).

Chaque cœur de souris a été débité en coupes sériées, ce qui a permis un inventaire complet de l'organe, ce qui représente une moyenne de 3 à 400 coupes. Plus de 24 000 coupes ont été étudiées en recourant aux techniques courantes d'histologie et aux colorations complémentaires.

C'est dans ces conditions que les constatations suivantes ont été faites :

1° Des lésions myocardiques ont été décelées chez des souris neuves et chez les souris inoculées de souches différentes.

2° La fréquence des lésions myocardiques a été reconnue dans 65,6 p. 100 des cas de souris neuves et dans 64,8 p. 100 des cas de souris inoculées : elles sont donc pratiquement à parité égale dans les deux lots.

Lenke, recherchant la fréquence de la myocardite chez des souris considérées comme normales, indique un pourcentage de 30 p. 100.

L'écart de statistique existant entre ces deux chiffres peut être imputé au fait que l'inventaire total du cœur que nous avons pratiqué permet de découvrir un nombre plus grand de lésions que celui qui est fourni par des prélèvements partiels du muscle cardiaque.

3° D'autre part, l'analyse histologique a conclu à l'entière similitude des lésions dans les deux lots de souris neuves et inoculées ; les seules différences observées dépendent uniquement de l'évolution et de l'ancienneté de la lésion.

Les souris présentent toutes les altérations de la myocardite aiguë atteignant le tissu conjonctivo-vasculaire, interstitiel et les

constituants de la cellule myocardique. Foyers d'infiltrats multiples et diffus, altération précoce de la fibre, hyperplasmie, vacuole, œdème, liquéfaction de la fibre. En bordure de la lésion, hypertrophie du myoplasme avec gigantisme du noyau, fréquemment en amitose ou en karyokinèse.

D'autres montrent des lésions ressemblant morphologiquement aux nodules d'Aschof.

Dans les lésions débutantes, l'infiltration est polymorphe : polynucléaires, lymphocytes et cellules à chromatine linéaire (œil de hibou, cellule d'Anitschkow) et dans les lésions plus tardives en voie de cicatrisation, apparaissent des fibrocytes, des calcifications, etc.

N. B. — Les cellules d'Anitschkow, considérées par certains auteurs comme pathognomoniques de la myocardite rhumatismale existent dans toutes les lésions de myocardite des souris neuves et des souris inoculées.

Les facteurs étiologiques et le pouvoir pathogène des différentes souches de virus n'influencent pas le type lésionnel, la morphologie des éléments fondamentaux de la lésion étant identique dans tous les cas.

L'enquête faite chez des souris non inoculées démontre la fréquence de la myocardite interstitielle. L'ignorance d'un facteur étiologique justifie mieux l'appellation de myocardite cryptogénique de celle de myocardite spontanée.

Nous n'avons pas observé de myocardite chez des souris nouveau-nées ni chez des souriceaux inoculés par Dalldorf de souche Coxsackie.

La myocardite n'apparaît que plus tard et sa fréquence augmente avec l'âge.

En poliomyélite humaine, notre matériel anatomique n'a pas été suffisant pour permettre une enquête extensive.

A titre d'indication, nous relatons ci-contre le résultat d'examens électrocardiographiques pratiqués sur 43 malades d'âges différents et atteints de formes différentes de poliomyélite.

CONCLUSION GÉNÉRALE.

Il résulte de nos recherches que :

1° Le seul critère histopathologique ne permet pas d'affirmer l'existence d'une myocardite exclusivement due à un virus poliomyélitique, un facteur étiologique d'une autre nature ayant pu déterminer antérieurement les lésions observées ;

2° La similitude des lésions relevées chez les souris inoculées de souches poliomyélitiques différentes utilisées : Lansing, M. M.,

S. K. Columbia, Theiler, etc., ne permet pas au critère histopathologique d'attribuer un *myocardiotropisme* à certain type de virus poliomyélitique.

Ainsi, le *fait anatomique* ne peut être invoqué pour admettre la pluralité des souches et moins encore pour en permettre leur classification.

ANNEXE.

Electrocardiographie en poliomyélite humaine, par Max Adant.

43 malades atteints de polyomélite ont été testés :

Résultats. — 43 ECG ont été étudiés (dérivations standard).

42 d'entre eux montraient une fréquence supérieure à 80, qui, pour la majorité, était de l'ordre de 90 à 120 systoles à la minute.

Dans 14 cas, il y avait une instabilité de la fréquence d'origine respiratoire.

Le rythme était sinusal dans tous les cas ; aucune extrasystole ne fut notée.

Onde P. — Dans 2 cas, où il y avait d'ailleurs une arythmie respiratoire en troisième dérivation, l'onde P était parfois inversée dans les systoles lentes.

Conduction auriculo-ventriculaire. — Normale dans tous les cas.

Complexe Q. R. S. — Sa durée était normale dans tous les cas.

Dans 5 cas, il y avait une variation périodique du voltage, d'origine respiratoire presque certainement.

Onde T. — Dans un cas, T était basse dans 3 dérivations, parfois négative en deuxième dérivation et toujours inversée en troisième dérivation.

Dans un autre cas, T était basse dans les 3 dérivations.

Dans les 2 cas où cette anomalie de l'onde T fut observée, il y avait d'ailleurs une importante arythmie respiratoire : dans l'un d'entre eux, la fréquence instantanée des systoles variait entre 56 et 90 à la minute.

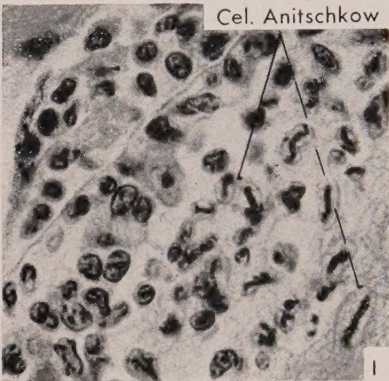
Axe électrique. — Normal dans tous les cas.

En conclusion : dans 43 cas de poliomyélite où un ECG fut fait, il n'y en eut que 2 qui présentaient des signes d'ailleurs relativement discrets, d'une altération de la contractilité myocardique.

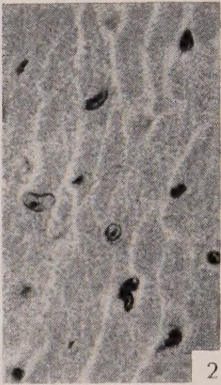
Ces résultats plaident très nettement contre une agression systématique et significative du myocarde dans la poliomyélite aiguë.



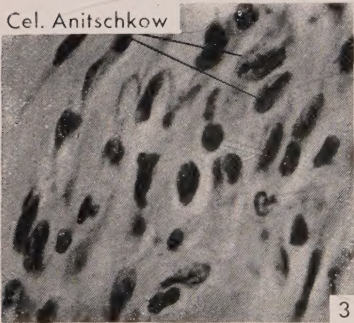
Digitized by the Internet Archive
in 2024



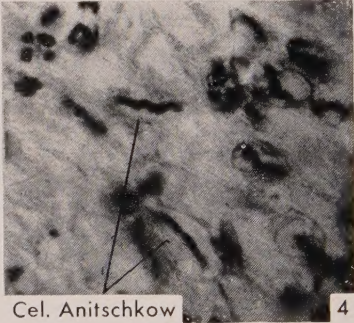
Neuve



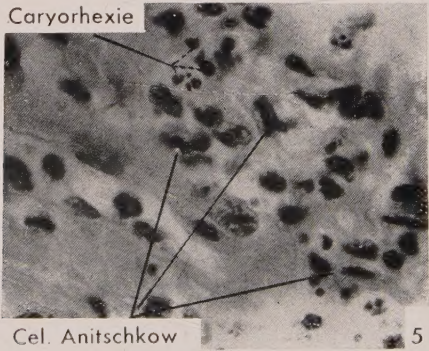
Myocarde normal



M. M.

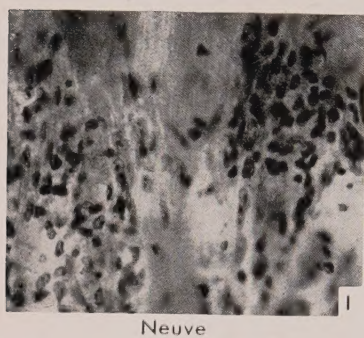


Lansing

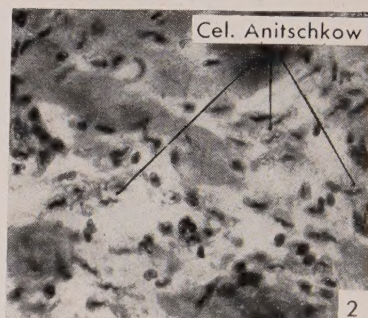


S. K. Columbia

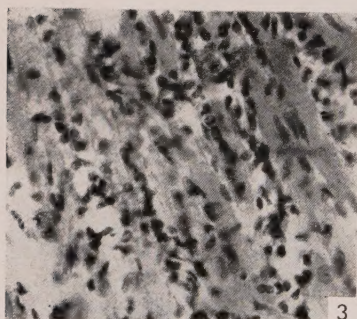
PLANCHE III.



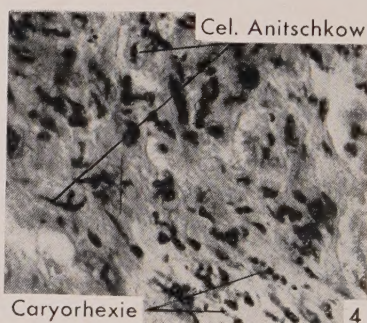
Neuve



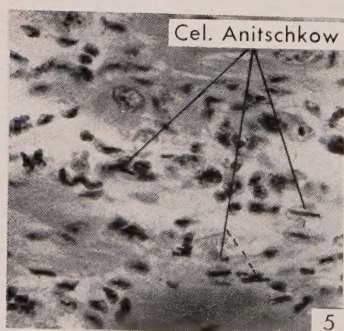
Neuve



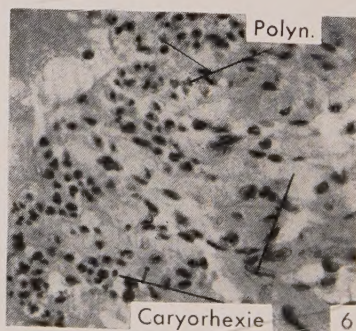
Lansing



Lansing



M. M.



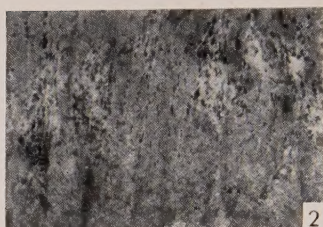
S. K. Columbia

PLANCHE II.

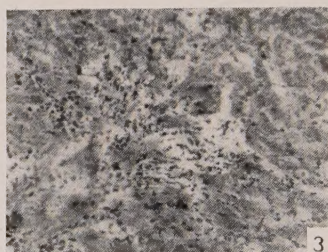
MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS



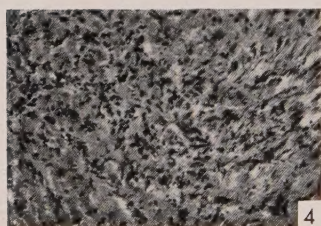
Neuve



Neuve



Neuve



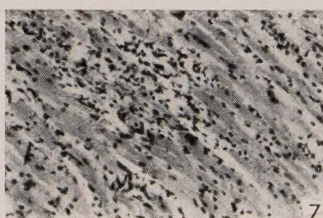
Lansing



Lansing



M. M.



Ornithose

PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

EXPLICATIONS DES PLANCHES

PLANCHE I

Similitude de lésions dans la myocardite aiguë chez les souris neuves et chez des souris injectées de souches poliomyélitiques.

FIG. 1, 2 et 3. — Souris neuves d'élevages divers. Lésions au niveau du tissu conjonctivo-vasculaire, aux insertions valvulaires, au niveau auriculaire et dans la paroi myocardique.

Myocardite à foyers multiples et diffus, morcellement et désintégration des faisceaux musculaires, infiltration d'éléments polymorphes, lymphocytes, polynucléaires, histiocytes. Nombreuses cellules à chromatine linéaire (œil de hibou, cellules d'Anitschkow), début de prolifération du conjonctif intermysial.

FIG. 4 et 5. — Souche Lansing.

FIG. 6. — Souche M. M.

FIG. 7. — « Ornithose ».

PLANCHE II

Détails des foyers inflammatoires myocardiques. Altérations non différenciables entre les souris neuves et les souris injectées.

FIG. 1 et 2. — Souris neuves.

FIG. 2. — Infiltrat leucocytaire avec nombreuses cellules d'Anitschkow.

FIG. 3 et 4. — Mêmes lésions, même infiltrat que dans les souris neuves.

FIG. 5. — Souche M. M., même image.

FIG. 6. — Souche S. K. Columbia, lésions auriculaires avec nombreuses caryorhexies, lymphocytes, polynucléaires.

PLANCHE III

FIG. 1. — Souris neuves, infiltration, désintégration de la fibre musculaire, œdèmes, vacuoles. Nombreuses cellules d'Anitschkow.

FIG. 2. — Fragment de myocarde normal.

FIG. 3. — Souche M. M., foyers d'infiltration dans l'axe longitudinal.

FIG. 4. — Lansing. Cellules à chromatine barrée, caryorhexies.

FIG. 5. — S. K. Columbia, désintégration de la fibre musculaire, nombreuses caryorhexies, œdème, vacuoles, cellules à chromatine barrée (même légende que figure 4).

DISTINCTION RAPIDE ENTRE *SALMONELLA* ET BACILLES PARACOLI DU GROUPE *BALLERUP-BETHESDA*

par R. BUTTIAUX (*)

(avec la collaboration de J. FLAMENT et N. BAYILLY).

[*Institut Pasteur de Lille. Service d'Hygiène expérimentale*] (1).

On connaît les difficultés rencontrées dans le diagnostic différentiel des *Salmonella* et des *B. paracoli* réunis par Kauffmann sous la désignation « groupe *Ballerup-Bethesda* » [1].

Les *Ballerup* avaient, initialement, été décrits par Kauffmann [2] sous le nom de *Salmonella ballerup*. Bruner, Edwards et Hopson [3] en ont fait ultérieurement l'étude antigénique détaillée. Ces auteurs jugent qu'il faut les considérer comme des *B. paracoli* pour les raisons suivantes: ils fermentent lentement le lactose par passages successifs en tubes de fermentation scellés; ils attaquent lentement, mais souvent, la salicine ou le saccharose; ils hydrolysent parfois l'urée sur milieu de Christensen; ils liquéfient quelquefois la gélatine. Ils sont caractérisés par la présence fréquente de l'antigène Vi; mais celui-ci n'est pas uniquement rencontré chez les *Salmonella*, car on le trouve aussi chez des *E. coli* ou autres coliformes.

Les *Bethesda* sont des *B. paracoli* intermédiaires pouvant simuler parfaitement les *Salmonella*, tant du point de vue biochimique que sérologique. Ils ont été individualisés par Edwards, West et Bruner [4]. Ils possèdent les propriétés biochimiques principales suivantes: fermentation lente ou très lente du lactose; glucose et mannite: + avec gaz; dextrose et saccharose: O ou +; Indole: O; Simmons-citrate: + assez tardivement; Acétoïne: O; R.M.T.: +; H₂S: + abondant; Hydrolyse inconstante de l'urée sur milieu de Christensen. Leur structure antigénique est assez homogène lorsqu'on la compare à celle des autres *B. paracoli*, coliformes ou aéro-génoïdes. Stuart, Galton et Mc Gann [5] ont montré ce

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 avril 1952.

(1) Travail effectué en partie grâce à une allocation de recherches de l'Institut National d'Hygiène.

phénomène pour les *Paracolobactrum intermedium* ; Moran et Bruner [6] l'ont confirmé pour les *Bethesda* où l'on peut distinguer 9 groupes O avec 25 types sérologiques basés sur la qualité des antigènes H. Cependant, chez eux comme chez tous les autres *B. paracoli* aérogènes ou anaérogènes, on peut trouver des antigènes O ou H de *Salmonella*. La présence des premiers est relativement fréquente [7, 8, 9, 10, 11, 12] ; celle des seconds reste, par contre, rare [13, 14] ou exceptionnelle [15].

Alors que les *Ballerup* sont assez rares, les *Bethesda* sont souvent isolés dans les fèces de sujets apparemment sains ou malades ; nous les trouvons, de même, fréquemment dans les eaux contaminées [16]. Divers procédés ont été recommandés pour distinguer les *Salmonella* des représentants du groupe *Ballerup-Bethesda*. Nous les rappellerons succinctement :

1° Certains font appel à l'existence de propriétés biochimiques spéciales. Chilton et Fulton [17] recherchent dans un milieu dit A. A. S. S. la fermentation des adonite, esculine, salicine et saccharose ; les *Salmonella* ne fermentent aucun de ces sucres ; les *B. paracoli* peuvent attaquer l'un ou plusieurs d'entre eux dans 80 p. 100 des cas. On peut de même rechercher la fermentation du lactose sur gélose lactosée à 10 p. 100 ; les P. C. la réalisent beaucoup plus rapidement que sur milieu sucré à 10 p. 1 000. Nous avons mis au point un tel milieu [14]. Dans ces conditions, cependant, certains *Bethesda* ne donnent un virage démonstratif qu'après dix ou quinze jours.

Blake Christensen [18] a montré que sur milieu faiblement peptoné et glucosé, beaucoup de P. C. sont capables d'hydrolyser l'urée ; un pourcentage élevé de *Ballerup* et *Bethesda* ne le fait pas pourtant.

2° D'autres utilisent les différences antigéniques les plus constantes entre *Salmonella* et *Bethesda*. Nous avons conseillé, en 1948 [10], de tester les souches suspectes dans les sérums O de *B. paracoli* ; les *Salmonella* n'y agglutinent jamais. En 1949, Galton et Stuart [19] recommandent dans le même but l'emploi d'un *pooled paracolobactrum intermedium antiserum*. Tenant compte de la rareté des antigènes H de *Salmonella* chez les P. C., Hajna et Damon [20] emploient un sérum polyvalent agglutinant la totalité de ceux-ci ; les souches de P. C. n'y agglutinent jamais ou presque.

Tous les procédés signalés ci-dessus ont des inconvénients. Les renseignements décisifs ne surviennent que tardivement dans le cas des distinctions biochimiques. La constance de celles-ci est loin d'être parfaite. La possession des anti-sérums polyvalents est difficilement réalisable dans les laboratoires de diagnostic de faible importance. Et l'on constate bien souvent, en pratiquant une étude biochimique et sérologique la plus fouillée possible, que

la distinction entre *Salmonella* et *Bethesda*, surtout, exige un laps de temps important.

Nous décrivons ci-dessous un procédé permettant de la réaliser en vingt-quatre heures, de façon constante et simple. Il résulte d'une application du milieu de Braun, Unat et Delibeyoglu [21], utilisé initialement par les auteurs pour différencier les *Escherichia coli* des *Aerobacter*.

LE MILIEU DE BRAUN, UNAT ET DELIBEYOGLU. — Voici la formule originale du milieu de base :

Peptone blanche (nous utilisons une peptone tryptique).	10 g
ClNa	5 g
Na ₂ HPO ₄	5,637 g
KH ₂ PO ₄	0,226 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 cm ³
pH	7,4 à 7,6

Nous préparons le milieu final de la façon suivante :

2,2 cm³ de la base gélosée précédente, fondue par chauffage à l'ébullition pendant quelques minutes, sont répartis dans des petits tubes de 80 mm × 10 mm, bouchés au coton cardé : on les stérilise à l'autoclave (vingt minutes à 120°). Le volume restant est alors de 2 cm³. Ils doivent être soigneusement capuchonnés pour éviter toute concentration, s'ils ne sont pas utilisés immédiatement. Au moment de l'emploi, on fait fondre le contenu du tube au bain-marie bouillant. On laisse refroidir jusqu'à 50°. On ajoute, avec précision, 0,1 cm³ de la solution :

Cyanure de potassium	0,5 g
Eau distillée	100 cm ³

On plonge le tube dans un bain-marie à 45° pendant quelques minutes. On mélange alors, à son contenu, 3 ôses (boucle de fil de platine de 6 mm de diamètre) d'une culture de vingt-quatre heures, en eau peptonée (incubation à 37°), du germe étudié. On refroidit rapidement sous l'eau du robinet.

Les tubes ensemencés sont portés à l'étuve à 37° durant vingt-quatre heures. Les microbes capables de se développer en présence de cyanure de potassium forment, à la surface du milieu, un anneau blanchâtre nettement et facilement visible. Les germes réfractaires ne cultivent pas.

Certains détails doivent retenir l'attention :

1° La solution de cyanure de potassium doit être de préparation immédiate ou récente. On peut la conserver pendant huit jours, dans un flacon bouché maintenu à + 4°. E. W. Taylor [22] dit qu'elle est capable de résister ainsi pendant un mois ; notre

expérience personnelle nous a montré que ce délai était excessif pour l'étude des *B. paracoli* et *Salmonella*.

2° Les quantités respectives de cyanure de potassium et de culture microbienne doivent être scrupuleusement observées. Lorsqu'elles ne le sont pas tout à fait, on observera, cependant, une culture de germes résistants dans la portion superficielle du milieu ; celle-ci se présentera, alors, non sous la forme d'un anneau, mais de colonies isolées moins facilement décelables.

3° La lecture peut être faite parfois en moins de vingt-quatre heures d'incubation à 37° ; dix-huit heures suffisent souvent. L'anneau n'apparaît, pour certains germes (*B. paracoli* 29 911 et certains *E. intermedium*), qu'après quarante-huit heures de séjour à cette température. On confirmera donc, quand il sera nécessaire, par une lecture supplémentaire faite à ce moment.

4° Il faut toujours utiliser trois témoins :

Le germe étudié doit être ensemencé sur milieu de base non additionné de cyanure. Il doit cultiver en surface.

Un milieu de base + cyanure est inoculé avec un *Aerobacter*. On doit constater un anneau.

Un milieu de base + cyanure est ensemencé avec un *Escherichia coli*. On ne doit pas observer de culture en surface.

UTILISATION DU TEST AU CYANURE POUR LA DISTINCTION ENTRE *Escherichia* ET *Aerobacter* (*Klebsiella*). — Silberstein, Rabinowitz et Bergner-Rabinowitz [23] ont étudié le comportement sur ce milieu des *Escherichiae* isolés des fèces, eaux et aliments. Ils constatent que les *Escherichia* : citrate = O et V. P. = O ne cultivent pas ; au contraire, les germes utilisant le citrate de sodium, produisant de l'acétyl-méthyl-carbinol (*Aerobacter*) ou non (*E. intermedium*) se développent. Ils concluent donc que l'emploi du milieu de Braun permet de différencier rapidement les *Escherichia coli* d'un autre groupe confondant les *Escherichia intermedium* et *Aerobacter*. On conçoit l'intérêt de cette assertion pour l'estimation de la potabilité des eaux d'alimentation [16].

Nous l'avons donc vérifiée. Les résultats de nos recherches sont indiqués dans le tableau I. Les souches étudiées proviennent de matières fécales, eaux et aliments variés.

On remarquera :

1° La totalité des *E. coli* étudiés est incapable de cultiver sur milieu au cyanure de potassium. Nous avons choisi des souches de caractères antigéniques différents (L, A, B). Les *E. coli mutabilis* se comportent de la même façon.

2° Tous les *Aerobacter* (*aerogenes* ou *cloacæ*) donnent un test de Braun positif (anneau net en moins de vingt-quatre heures).

3° Il faut, par contre, distinguer parmi les *Escherichia intermedium* (citrate = + — V. P. = O) :

TABLEAU I.

ESPÈCES	I. M. V. I. C.	NOMBRE examiné	TEST de Braun +	PAS DE CULTURE
<i>E. coli</i> aérogènes ou anaérogènes.	Indole : +. Citrate : 0. R. M. T. : +. A. M. C. : 0.	69	0	69
<i>E. coli mutabilis.</i>	<i>Id.</i>	5	0	3
<i>E. intermedium.</i>	Indole : +. Citrate : +. R. M. T. : +. A. M. C. : 0.	4	0	4
<i>E. intermedium</i> et <i>E. freundii.</i>	Indole : 0. Citrate : +. R. M. T. : +. A. M. C. : 0.	19	19	0
<i>Aerobacter.</i>	Indole : 0 ou +. Citrate : +. R. M. T. : —. A. M. C. : +.	30	30	0

a) Celles produisant de l'indole : elles se comportent comme les *E. coli*.

b) Les Anindologenes cultivant comme les *Aerobacter*.

La conclusion suivante s'impose : dans l'estimation de la potabilité de l'eau, le test de Braun est incapable de faire d'une manière certaine la distinction entre *E. coli*, d'une part, et *Escherichia intermedium* et *Aerobacter*, d'autre part. Or les souches d'*E. intermedium indologenes* peuvent être isolées très souvent dans certaines eaux ne présentant pas de contaminations fécales décelables.

COMPORTEMENT DES *B. PARACOLI* SUR MILIEU DE BRAUN. — Nous avons étudié, de la même façon que pour les *Escherichia-Aerobacter*, la façon dont se comportent les *Paracolobactrum* en présence de cyanure de potassium. Nos résultats sont réunis dans le tableau II. Ils concernent des germes provenant surtout de matières fécales, plus rarement d'eaux ou de substances alimentaires.

On voit que ces *B. paracoli* aérogènes présentent sur milieu au cyanure des caractères très sensiblement analogues à ceux des *Escherichææ*.

1° Tous les *P. C.* coliformes sont inhibés.

2° La totalité des *P. C. aerogenoides* cultive.

3° Comme pour les *E. intermedium*, les *P. C. intermedium* indologènes sont presque toujours incapables de se développer, alors que les formes anindologènes le font constamment.

TABLEAU II.

ESPÈCES	I. M. V. I. C.	NOMBRE examiné	TEST de Braun +	PAS DE CULTURE
<i>Paracolobactrum</i> coliformes.	Indole : +. Citrate : 0. A. M. C. : 0.	23	0	23
<i>Paracolobactrum</i> <i>intermedium</i> (H ² S : 0).	Indole : +. Citrate : +. A. M. C. : 0.	5	1	4
<i>Paracolobactrum</i> <i>intermedium</i> (H ² S : 0 ou H ² S : +).	Indole : 0. Citrate : +. A. M. C. : 0.	68	68	0
<i>Paracolobactrum</i> <i>aerogenoides</i> .	Indole : + ou 0. Citrate : +. A. M. C. : +.	26	26	0

Ce dernier groupe de *Paracolobactrum intermedium* contenait, dans nos expériences, toute une série de *Bethesda*. Nous avons donc pensé à étudier le milieu de Braun pour distinguer, si possible, ces organismes des *Salmonella*.

LE TEST DE BRAUN POUR LA DIFFÉRENCIATION DES *Salmonella* ET DU GROUPE *Ballerup-Bethesda*. — Nous avons étudié le comportement sur ce milieu des différentes espèces de *Salmonella* classiques, des *Ballerup*, des *Arizona* et des *Bethesda*.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III.

Ils mettent en évidence les importantes constatations suivantes :

1° Les 280 *Salmonella* étudiées, appartenant à des groupes différents, ne sont pas capables de cultiver sur milieu au cyanure de potassium. On peut donc admettre qu'il s'agit d'un caractère propre au genre *Salmonella*. Il est constant.

2° 56 *Bethesda* correspondant aux différents types antigéniques de Edwards, West et Bruner, ne sont pas inhibés, au contraire, par le cyanure de potassium. Le nombre d'exemplaires paraît suffisant pour qu'on puisse considérer ce phénomène comme spécifique.

TABLEAU III.

PROVENANCE	ESPÈCES	NOMBRE examiné	TEST de Braun +	PAS DE CULTURE
	<i>Salmonella.</i>			
	Groupe A.			
I. P. P. et C. I. S.	<i>S. paratyphi</i> A	3	0	3
	<i>S. paratyphi</i> A variété <i>durazzo</i>	1	0	1
	Groupe B.			
	<i>S. paratyphi</i> B (1) [1 variété <i>Oleusce</i>]	27	0	27
	<i>S. typhi murium</i> (2).	29	0	29
	<i>S. abortus equi</i>	5	0	5
I. P. P. et I. P. L.	<i>S. stanley</i>	4	0	4
	<i>S. brandenburg</i>	5	0	5
	<i>S. budapest</i>	2	0	2
	<i>S. arechavaleta</i> , <i>S. bispebjerg</i> , <i>S. reading</i> , <i>S. chester</i> , <i>S. sandiego</i> , <i>S. derby</i> , <i>S. essen</i> , <i>S. bredeney</i> , <i>S. köln</i> (1 exemplaire de chaque espèce).	9	0	9
	Groupe C.			
	<i>S. paratyphi</i> C	4	0	4
	<i>S. cholerae</i> suis (8 variétés <i>kunzensdorf</i>).	13	0	13
	<i>S. bareilly</i>	6	0	6
	<i>S. thompson</i>	3	0	3
	<i>S. muenchen</i>	4	0	4
	<i>S. oslo</i> , <i>S. oranienburg</i> (2 de chaque).	4	0	4
I. P. P. et I. P. L.	<i>S. glostrup</i> , <i>S. virginia</i> , <i>S. kentucky</i> , <i>S. typhi</i> suis, <i>S. montevideo</i> , <i>S. potsdam</i> , <i>S. virchow</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. papuana</i> , <i>S. hartford</i> , <i>S. mikawasima</i> , <i>S. tennessee</i> , <i>S. manhattan</i> (1 exemplaire de chaque espèce).	15	0	15
	<i>S. newport</i>	6	0	6
	<i>S. bovis mortificans</i>	2	0	2
	<i>S. bonariensis</i> , <i>S. duesseldorf</i> , <i>S. tallahassee</i> , <i>S. glostrup</i> , <i>S. virginia</i> , <i>S. kentucky</i> (1 exemplaire de chaque espèce).	6	0	6
	Groupe D.			
	<i>S. typhi</i> (1).	48	0	48
	<i>S. enteritidis</i> (2).	13	0	13
I. P. P. et I. P. L.	<i>S. panama</i>	4	0	4
	<i>S. blegdam</i> , <i>S. dublin</i> (3 de chaque).	6	0	6
	<i>S. sendai</i>	2	0	2
	<i>S. miami</i> , <i>S. loma-linda</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. rostock</i> , <i>S. moscow</i> , <i>S. javiana</i> (1 exemplaire de chaque espèce).	6	0	6
	<i>S. gallinarum pullorum</i>	8	0	8

C. I. S., centre international des *Salmonella* (Dr Kauffmann), Copenhague; U. K., Université de Kentucky, Agricultural Experiment Station, Lexington (D. W. Bruner); I. P. P., Centre des *Salmonella* de l'Institut Pasteur de Paris (Dr Bonnefoi, Dr Grabar et Le Minor); I. P. L., Institut Pasteur de Lille (Service d'Hygiène expérimentale).

(1) Souches de différents types phages.

(2) Souches de différentes origines (humaines, animales, alimentaires).

PROVENANCE	ESPÈCES	NOMBRE examiné	TEST de Braun +	PAS DE CULTURE
I. P. P.	Groupe E.			
	<i>S. anatum</i> , <i>S. london</i> (5 de chaque)	10	0	10
	<i>S. senftenberg</i>	3	0	3
	<i>S. shangani</i> , <i>S. zanzibar</i> , <i>S. uganda</i> , <i>S. le- xington</i> , <i>S. newington</i> , <i>S. illinois</i> , <i>S. niloese</i> (1 exemplaire de chaque)	7	0	7
I. P. P.	Groupe F.			
	<i>S. marseille</i> , <i>S. luciana</i> , <i>S. aberdeen</i> , <i>S. ru- bislaw</i> (1 exemplaire de chaque espèce) .	4	0	4
I. P. P.	Groupe G.			
	<i>S. havana</i> , <i>S. worthington</i> , <i>S. poona</i> , <i>S. cu- bana</i> (1 exemplaire de chaque espèce). .	4	0	4
I. P. P.	Groupe H.			
	<i>S. onderstepoort</i> , <i>S. carrau</i> , <i>S. sundsvall</i> (1 exemplaire de chaque)	3	0	3
I. P. P.	Groupe I.			
	<i>S. hvittingfoss</i>	2	0	2
	<i>S. gaminara</i>	1	0	1
I. P. P.	Autres groupes.			
	<i>S. kirkee</i> , <i>S. cerro</i> , <i>S. minnesota</i> , <i>S. pomona</i> , <i>S. tel aviv</i> , <i>S. urbana</i> , <i>S. adelai te</i> , <i>S. inver- ness</i> , <i>S. champaign</i> (1 exemplaire de chaque espèce)	9	0	9
C. I. S.	<i>Ballerup</i> (3).			
I. P. P.	<i>Ballerup</i> original (S. 107)	1	1	0
I. P. L.	<i>Ballerup</i> (S. 7851)	1	1	0
I. P. L.	<i>Ballerup</i> (Lille)	1	1	0
U. K.	<i>Bethesda</i> .			
I. P. L.	<i>Bethesda</i> (4).	13	13	0
	<i>Bethesda</i> (2).	43	43	0
C. I. S.	<i>Arizona</i> .			
U. K.	<i>Arizona</i> original	1	0	1
I. P. L.	<i>Arizona</i> S. 39	1	0	1
	<i>Arizona</i> G ₁ et G ₄	2	0	2
	<i>Arizona</i> (Lille)	2	0	2

(3) Les 3 *Ballerup* étudiés sont Vi + et donnent des colonies V et W.

(4) Ces 13 souches nous ont été envoyées par D. W. Bruner avec les dénominations : Na 1 A, Na 23, Na 4, Na 2 C, Na 11 (complet), Na 11 (phase 1), Na 11 (phase 2), Na 22 original, Na 22, Na 19, Na 10, Na 20, Na 30.

3° 3 *Ballerup* présentent la même aptitude à se développer sur le milieu de Braun. Si l'on envisageait ce seul caractère, on y trouverait une raison de plus pour réunir, avec Kauffmann, les *Ballerup* et *Bethesda* dans un même groupe [1]. Il faut remarquer, cependant, que le nombre de souches examinées par nous est insuffisant pour tirer une conclusion définitive. Les auteurs qui en ont à leur disposition une abondante diversité pourront plus facilement la poser.

4° Les *Arizona* se séparent nettement des *Ballerup-Bethesda*. Ils se comportent comme des *Salmonella*, en présence de cyanure de potassium qui empêche leur développement. Ici encore, il sera nécessaire d'étudier plus d'exemplaires ; nous le ferons, d'ailleurs, prochainement.

COMPORTEMENT DE QUELQUES AUTRES TRIBUS, GENRES OU GROUPES D'*Enterobacteriaceæ* SUR LE MILIEU AU CYANURE DE POTASSIUM. — A titre accessoire, nous avons étudié ce phénomène de façon fort incomplète. Nous reprendrons ces recherches ultérieurement. Nous les signalons cependant, ici, dans leur état actuel (tableau IV).

TABLEAU IV.

ESPÈCES	NOMBRE examiné	TEST de Braun +	PAS DE CULTURE
<i>Proteus hauseri</i> (1)	49	49	0
<i>Proteus morganii</i>	6	6	0
<i>Proteus rettgeri</i>	3	3	0
<i>Shigella paradysenteriae</i>	4	0	4
<i>Shigella sonnei</i>	5	0	5
<i>Alcalescens</i>	5	0	5
P. C. 29.944 (2)	9	9	0

(1) *Proteus hauseri* (Kauffmann [1]) comprend *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis*.
 (2) Désignées par Kauffmann [1] sous la dénomination *Providencia group*.

Remarquons seulement l'aptitude des *Proteus hauseri* à cultiver sur milieu de Braun. Nous y reviendrons ci-dessous.

APPLICATION PRATIQUE DU TEST DE BRAUN AU COURS DE LA RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DES *Salmonella*. — Elle va faciliter beaucoup la mise en évidence des *Salmonella* au cours des coprocultures ou examens de produits alimentaires tels que laits, eaux,

viande, etc., contenant souvent des *Bethesda*. Toute colonie suspecte isolée sur milieu électif (S. S. agar ; gélose au désoxycholate-citrate-lactose ; gélose de Kristensen, Lester et Jurgens) sera reportée sur un milieu rapide de diagnostic (Kligler ou Hajna). Les caractères suivants : pas de fermentation du lactose, — fermentation du glucose avec gaz, — production d'H₂S, font penser aux 4 éventualités : *Salmonella*, *Arizona*, *Proteus hauseri* (de nombreuses formes n'envahissent pas le milieu au premier passage) ou *Ballerup-Bethesda*.

On pratiquera une recherche rapide de l'uréase. Nous avons coutume d'utiliser, à cet effet, le test de Elek [24]. Elle éliminera les *Proteus*. Onensemencera, si elle est négative, une eau peptonée. On incubera celle-ci, vingt-quatre heures, à 37°. On pratiquera avec elle le test de Braun. S'il est positif, il s'agira d'un germe appartenant au groupe *Ballerup-Bethesda* ; si la souche examinée ne cultive pas sur milieu au cyanure, on aura affaire à *Salmonella* ou *Arizona*. L'étude antigénique et la biochimie préciseront, alors seulement, l'une ou l'autre de ces deux dernières éventualités. D'ailleurs, si l'on néglige le rôle pathogène probable des *Ballerup*, parfois possible des *Bethesda*, et si l'on ne tient compte que des seules *Salmonella*, la recherche de l'uréase est inutile. En effet, les *Proteus*, jusqu'à plus ample informé, se conduisent comme les *Ballerup-Bethesda* sur le milieu au cyanure de potassium.

RÉSUMÉ. — La gélose au cyanure de potassium décrite par Braun, Unat et Delibeyoglu [21] permet la distinction facile et rapide entre *Escherichia coli* et *Aerobacter*. Les *Escherichia* intermédiaires, par contre, cultivent ou non sur ce milieu. Son emploi n'est donc pas recommandable pour l'identification des *Escherichæ* des eaux ; la potabilité de celles-ci est fondée, en effet, sur une différenciation parfaite entre deux groupes : *Escherichia coli* d'une part, et ensemble *Escherichia* intermédiaires-*Aerobacter* de l'autre.

Nous avons étudié le comportement des *Salmonella*, des *Arizona* et du groupe *Ballerup-Bethesda* sur ce milieu de Braun ; nous avons constaté que :

1° Les *Salmonella* n'y cultivent pas. Il en est de même pour les *Arizona*.

2° Les *Ballerup-Bethesda* s'y développent rapidement.

Son emploi permet donc le dépistage, en moins de vingt-quatre heures, des *Bethesda* rencontrés si souvent au cours des recherches systématiques de *Salmonella*. Il assure l'élimination de ces B. paracoli simulant fréquemment les *Salmonella*, soit par leurs propriétés biochimiques, soit même par leur structure antigénique.

Nous serions heureux de voir l'étude du test de Braun étendue

par les auteurs en ayant les possibilités, à une plus grande variété d'espèces de *Ballerup*, *Arizona* et à ces Entérobactéries « inhabituelles » décrites par Edwards et West [25] et par Seligmann et Saphra [26]; ces dernières sont, en effet, des intermédiaires entre les *B. paracoli* et les *Arizona* ou les *Arizona* et les *Salmonella*.

Nous remercions vivement MM. D. W. Bruner, F. Kauffmann et L. Le Minor, qui ont bien voulu nous envoyer une partie des souches utilisées au cours de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*. Ejnar Munksgaard, édit., Copenhague, 1951, 137.
- [2] F. KAUFFMANN et MOLLER. *J. Hyg.*, 1940, **40**, 246.
- [3] D. W. BRUNER, P. R. EDWARDS et Alice S. HOPSON. *J. Infect. Dis.*, 1949, **85**, 290.
- [4] P. R. EDWARDS, M. G. WEST et D. W. BRUNER. *J. Bact.*, 1948, **55**, 711.
- [5] C. A. STUART, M. M. GALTON et V. Mc GANN. *J. Bact.*, 1948, **56**, 411.
- [6] A. B. MORAN et D. W. BRUNER. *J. Bact.*, 1949, **58**, 695.
- [7] O. FELSENFELD et VIOLA MAE YOUNG. *Am. J. Digest. Dis.*, 1945, **12**, 396.
- [8] VIOLA MAE YOUNG. *J. Bact.*, 1946, **51**, 611.
- [9] J. P. AMARAL, E. BIOCCA, O. BUR et M. B. ESTEVES. *Memb. Inst. Butantan*, 1946, **49**, 221.
- [10] R. BUTTIAUX et A. KESTELOOT. *Annales Inst. Pasteur Lille*, 1948, **4**, 103.
- [11] R. MUSHIN. *Austral. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1949, **27**, 543.
- [12] R. SAXHOLM. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 443.
- [13] P. R. EDWARDS, A. B. MORAN et D. W. BRUNER. *J. Immunol.*, 1948, **60**, 529.
- [14] R. BUTTIAUX et A. KESTELOOT. *Ces Annales*, 1950, **78**, 691.
- [15] Ingelotte DÜWER-DOHRMANN. *Zentr. Bakt. I.*, 1951, **156**, 426.
- [16] R. BUTTIAUX. *L'analyse bactériologique des eaux de consommation*. Editions médicales Flammarion, Paris, 1951.
- [17] M. CHILTON et Mc Donald FULTON. *J. Lab. Clin. Med.*, 1946, **31**, 824.
- [18] W. Blake CHRISTENSEN. *J. Bact.*, 1946, **52**, 461.
- [19] M. M. GALTON et C. A. STUART. *J. Bact.*, 1949, **58**, 545.
- [20] A. A. HAJNA et S. R. DAMON. *Publ. Health Rep.*, 1950, **65** (4).
- [21] BRAUN, UNAT et DELIBEOGLU. *Istanbul Seririyati*, 1941, **23**, 11.
- [22] E. W. TAYLOR. *Bull. Hyg.*, 1951, **26**, 919.
- [23] W. SILBERSTEIN, K. RABINOWITZ et S. BERGNER-RABINOWITZ. *Acta medica Orientalia*, 1951, **10**, 57.
- [24] Stephen D. ELEK. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1948, **60**, 183.
- [25] P. R. EDWARDS et M. G. WEST. *J. Infect. Dis.*, **87** (2), 184.
- [26] E. SELIGMANN et I. SAPHRA. *Publ. Health Rep.*, 1951, **66**, 1369.

UNE DISSOCIATION DE *S. PARATYPHI* A LIÉE A L'ANTIGÈNE H

par L. LE MINOR (*).

(Institut Pasteur, Centre des Salmonella.)

P. Nicolle, A. Jude et L. Le Minor [1] ont rapporté, en 1950, l'intérêt, pour l'examen des colonies V. VW et W de *S. typhi*, de l'utilisation d'un éclairage oblique par rayons parallèles. Nous décrivons ici un cas de dissociation que cette méthode nous a permis de déceler chez une souche de *S. paratyphi* A.

Lors d'un des contrôles des souches de *S. paratyphi* A entrant dans la composition du vaccin TAB de l'Institut Pasteur, nous avons remarqué que l'une d'elles, la souche A 205, isolée d'hémoculture le 22 septembre 1946, à Saigon (Indochine), donnait deux types de colonies. Ces deux types, nets en utilisant la transillumination oblique sont difficiles à distinguer par un examen normal. Les unes (rares) avaient une teinte jaune, peu irisée. Les autres (la majorité) avaient une teinte bleutée et étaient comparables aux colonies W de *S. typhi*.

Une suspension d'une colonie jaune, en bouillon, isolée à nouveau, donna une culture homogène de colonies jaunes. Par contre, une colonie bleue, traitée de la même manière, donna un mélange de nombreuses colonies bleues et de rares colonies jaunes. Une colonie bleue de ce dernier isolement donna ensuite une culture homogène de colonies bleues.

Après une dizaine de repiquages qui s'étaient jusqu'alors montrés homogènes, nous avons observé, sur une boîte de la variante bleue, 4 colonies jaunes dont une présentait une irisation intense (comparable à la forme V de *S. typhi*) et une colonie R. Les repiquages de ces variantes restèrent homogènes.

A partir de la culture de la collection des vaccins (1), nous avons eu ainsi 4 variantes :

La variante bleue (BL) ;

La variante jaune (J) ;

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 avril 1952.

(1) Les souches de vaccins, qui sont contrôlées tous les six mois, sont conservées sur milieu à l'œuf à + 4°, dans une collection spéciale.

La variante irisée (IR) ;

La variante R (R).

Nous avons alors examiné un autre tube de milieu à l'œuf de la même souche existant dans la collection générale des *Salmonella*. Celui-ci datait de décembre 1951 ; la culture originelle étant contaminée par des moisissures, avait été à cette date ensemencée sur bouillon et isolée sur milieu de Drigalski. Une colonie d'aspect S, agglutinée par les sérums anti I-II et *a*, a été repiquée sans que ces examens fassent remarquer quelque chose d'anormal. Lors du nouvel examen, à l'occasion de la dissociation de la souche du vaccin, nous nous sommes aperçus que cette culture, homogène à l'isolement, était immobile, bien qu'agglutinée normalement par le sérum *a*. Cette souche provenait certainement de la souche A 205 originelle, sans confusion possible. Nous avons essayé de trouver cette variante dans les isolements de la souche du vaccin : 30 colonies sur gélose ordinaire et 30 colonies sur milieu de Drigalski furent examinées sans succès. Examinées par transillumination oblique, les colonies de cette variante immobile, que nous appellerons IM, ont une teinte voisine de la variante BL.

Si, colorées par la méthode de Gram, les cinq variantes sont identiques, par contre la coloration de Casarès-Gil révèle que seule la variante IR ne possède pas de cils, contrairement aux variantes BL, J, IM et R qui présentent toutes de nombreux cils.

Les caractères biochimiques ont été exactement les mêmes pour les cinq variantes : xylose, lactose, saccharose, glycérol (Stern), citrate de sodium (Simmons), *d*-tartrate de sodium (Kauffmann), production d'H₂S : négatifs. Arabinose, glucose mannite, dulcité, maltose : positifs en un jour. Rouge neutre : réduction partielle. De plus, les agglutinations en eau physiologique et eau salée à 5 p. 100, trypaflavine et réactif de Millon, ont été négatives, sauf évidemment pour la variante R. Un caractère particulier de la variante IM réside dans le fait que, bien que donnant une suspension homogène, elle est plus difficile que les autres à détacher de la gélose.

L'étude de la mobilité sur bouillon gélifié à 5 g p. 1 000 nous a montré, par contre, des différences nettes : 12 colonies J, 12 colonies BL, les variantes IR, IM et R ont été ensemencées par piqûre sur ce milieu. Alors que les variantes BL et R, composées de germes très mobiles, diffusaient rapidement dans le milieu, les repiquages des colonies J forment une houppe autour du trait d'ensemencement n'atteignant que le lendemain les parois du tube. Enfin, les variantes IR et IM se sont montrées immobiles, même après dix jours (étuve et laboratoire). A partir des quatre types S, nous avons préparé une suspension O et une suspension formolée (bien que le terme H ne convienne

guère à des cultures immobiles, nous adopterons pour toutes les suspensions formolées ce symbole).

Le titrage, en tubes, nous a donné les taux suivants :

TABLEAU I.

Suspensions :	S. para-typhi A :	O 901 :	S. senftenberg :	S. para-typhi B :
A H :	12.800 :	:	:	:
BL H :	12.800 :	:	:	:
J H :	3.200* :	:	:	:
IR H :	1.600* :	:	:	:
IM H :	6.400 :	:	:	:
A O :	3.200 :	1.600 :	1.600 :	200 :
BL O :	3.200 :	1.600 :	1.600 :	400 :
J O :	3.200 :	1.600 :	1.600 :	400 :
IR O :	3.200 :	1.600 :	1.600 :	400 :
IM O :	6.400 :	1.600 :	1.600 :	400 :

Les suspensions AH et AO sont celles servant à la pratique courante des séro-diagnostics. Nous les avons employées comme témoins.

Alors que les agglutinats avec les suspensions AH, BLH et IMH présentaient la morphologie habituelle, ceux obtenus avec les suspensions JH et IRH étaient nettement atypiques (*). Plus fins que les agglutinats H habituels, non dissociables par agitation, ils sont granulaires comme les agglutinats O de suspensions alcoolisées. Cette agglutination apparaît au bout de deux heures d'étuve, mais est beaucoup plus nette au bout de dix-huit heures.

Les agglutinations H de ces variantes montraient donc des différences nettes quantitatives et qualitatives. Nous avons alors chargé des lapins avec des cultures en bouillon, formolées, des cinq variantes. Les lapins ont reçu, à quatre jours d'intervalle, 0,5 cm³, 1 cm³ et 2 cm³ par voie intraveineuse, et ont été saignés dix jours après la dernière injection. Voici le résultat du titrage de ces sérums :

Tous les agglutinats étaient typiques, sauf ceux marqués d'un astérisque. On retrouvait ici l'agglutination atypique précédemment décrite.

TABLEAU II.

Suspensions:	J	BL	IR	IM	R
BL H	3.200	12.800	0	25.600	25.600
J H	1.600*	1.600*	3.200*	3.200*	0
IR H	800*	800*	3.200*	800*	0
IM H	3.200	12.800	0	25.600	25.600
BL O	1.600	1.600	6.400	3.200	0
J O	1.600	1.600	6.400	3.200	0
IR O	1.600	1.600	6.400	3.200	0
IM O	1.600	1.600	3.200	3.200	0

Nous avons ensuite procédé à des saturations croisées : 20 cm³ au 1/10 des sérums BL, J, IR, IM et R furent saturés par la culture de trois boîtes de Roux des souches hétérologues vivantes, centrifugée et lavée. Nous avons en outre saturé les sérums J et BL par des germes BL et J chauffés deux heures trente à 100°. Les titrages ont donné les résultats suivants (tabl. III) :

DISCUSSION. — Ces résultats nous montrent que :

1° La variante BL correspond à une souche de *S. paratyphi* A normale.

2° La variante IM est antigéniquement complète ; mais, bien que possédant l'antigène H sérologiquement normal, elle est immobile. Une souche ciliée et riche en antigène H n'est donc pas obligatoirement mobile. Une observation analogue a déjà été faite par Edwards, Moran et Bruner [2].

3° La variante J est, quant à l'antigène H, intermédiaire entre les variantes BL et IR. L'agglutination atypique de la suspension JH dans son sérum homologue est complètement saturée par les variantes BL, IM et la variante IR qui est dénuée d'antigène H, ainsi que par une culture BL chauffée. Néanmoins, cette variante J contient de l'antigène H, puisque dans le sérum J, tel quel ou saturé par IR, les variantes BL et IM donnent une agglutination H typique. D'autre part, la variante J est capable de saturer les agglutinines H des sérums BL et IM. Nous pensons que l'agglutination atypique des suspensions formolées J et IR est liée à l'antigène O. En effet :

a) Cette agglutination ne se produit pas dans le sérum R ;

TABLEAU III.

Sérums	Suspensions							
	BL H	J H	IR H	IM H	BL O	JO	IR O	IM O
J saturé par BL	0	0	0	0	0	0	0	0
J saturé par IR	1600	0	0	1600	0	0	0	0
J saturé par IM	0	0	0	0	0	0	0	0
J saturé par BL chauffé	1600	0	0	1600	0	0	0	0
BL saturé par J	0	0	0	0	0	0	0	0
BL saturé par IR	12800	0	0	12800	0	0	0	0
BL saturé par IM	0	0	0	0	0	0	0	0
BL saturé par J chauffé	12800	0	0	12800	0	0	0	0
IM saturé par BL	0	0	0	0	0	0	0	0
IM saturé par IR	25600	0	0	25600	0	0	0	0
IM saturé par J	0	0	0	0	0	0	0	0
R saturé par IM	0			0				

b) Des suspensions formolées des souches O 901 et OB 3173 donnent, dans les sérums Eberth et *S. paratyphi* B, des agglutinats morphologiquement comparables, alors qu'elles n'ont pas d'antigène H ;

c) Cette agglutination ne se produit plus quand on a saturé les agglutinines O par des souches chauffées.

La variante J doit donc être considérée comme possédant de l'antigène H, non agglutinable, mais néanmoins décelable : elle est agglutinogène H et capable de saturer des agglutinines II (il faut pour ceci de plus grandes quantités de culture qu'avec les variantes BL et IM).

4° La variante IR, immobile, est une variante O pure.

5° La variante R est pure : elle ne contient plus d'antigène O, seulement de l'antigène H.

6° Les antigènes O des variantes S sont semblables. Les résultats des saturations par les germes vivants le démontrent. De plus, nous avons fait les mêmes saturations croisées avec des cultures chauffées deux heures trente à 100°. Les agglutinines O sont toutes saturées.

De la variante BL à la variante IR, il y a donc eu perte progressive de l'antigène H, la variante J constituant une étape intermédiaire.

Notons enfin qu'aucune de nos variantes n'est agglutinée par le sérum anti 1,5. La dissociation de la souche A 205 n'a aucun rapport avec la dissociation α -1,5 décrite par Edwards et Bruner [3, 4].

Ce type de dissociation de *S. paratyphi* A ne semble pas très fréquent : nous l'avons recherché sans succès chez 36 autres souches de *S. paratyphi* A.

RÉSUMÉ.

L'examen par transillumination oblique d'une souche de *S. paratyphi* A a permis d'en isoler 5 variantes :

1° Une variante bleutée antigéniquement et morphologiquement complète ;

2° Une variante jaune, ciliée, mais peu mobile. Elle n'est pas H agglutinable. Cependant, elle est H agglutinogène, et capable de saturer les agglutinines H d'un sérum ;

3° Une variante irisée, non ciliée, O pure, immobile ;

4 Une variante normalement ciliée, antigéniquement complète, mais totalement immobile ;

5° Une variante R.

Le taux d'agglutination des immunsérums correspondants et les résultats des saturations croisées sont rapportés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. NICOLLE, A. JUDE et L. LE MINOR. *Ces Annales*, 1950, **78**, 572.
- [2] P. R. EDWARDS, A. MORAN et D. W. BRUNER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **62**, 296.
- [3] P. R. EDWARDS et D. W. BRUNER. *Third International Congress for Microbiology*, New-York, 1939 ; *Report of Proceedings*, 1940, 629.
- [4] P. R. EDWARDS. *J. Bact.*, 1950, **59**, 135.

ETUDE DE L'ANTIGÈNE VI A L'AIDE D'UNE TECHNIQUE D'HÉMAGGLUTINATION PASSIVE

par P. CORVAZIER (*).

(Institut Pasteur, Paris, Service de Chimie microbienne.)

Au cours de l'étude immunochimique de l'antigène Vi du bacille d'Eberth, nous avons été amené à rechercher la valeur de la réaction de Middlebrook et Dubos, utilisée par ces auteurs pour mettre en évidence des anticorps tuberculeux [1], vis-à-vis de nos systèmes précipitants.

Cette réaction, désormais très généralement utilisée en immunologie, avait, dans ce même laboratoire, donné matière aux observations préliminaires de O. Bier publiées récemment dans ces *Annales* [2] et de P. Oeding (non publiées). Une certaine dissociation a été constatée dans les réponses des réactions d'hémolyse, d'hémagglutination et de congélation à l'adsorption sur les globules rouges (G. R.) de mouton d'antigènes somatiques O et Vi de *Salmonella typhi*. La réaction d'hémolyse mettait en évidence une sensibilisation particulière des globules à l'antigène somatique O.

Le recours à l'hémagglutination pour déceler et étudier les substances solubles non dégradées de souches éberthiennes de forme V et non plus les antigènes somatiques, nous a montré que cette réaction se révélait une technique d'une rigoureuse spécificité, même en présence d'immunsérums riches en anticorps O. L'exposé de cette technique et les conditions de cette spécificité font l'objet de ce travail. Des essais du même genre ont été faits par Landy [3], par Spaun [4] et par L. et S. Le Minor et J. Grabar avec des surnageants de vaccins microbiens [5].

I. TECHNIQUES. — *Préparation des « substances solubles »*. — La souche Eberth 415 existe sous les deux formes V et W ; la première contient les antigènes O, H et Vi et n'est pas agglutinable par des sérums anti-O ; la deuxième ne contient que des antigènes O et H et n'est pas agglutinable par des sérums anti-Vi

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mars 1952.

(préparés à partir de souches non éberthiennes, ici *Ballerup*).

Une culture de vingt-quatre heures sur gélose de ces deux souches est recueillie en solution salée isotonique et centrifugée ; les culots microbiens sont remis en suspension dans une solution saline, que l'on agite modérément pendant une demi-heure ; les germes sont à nouveau centrifugés jusqu'à clarification des solutions surnageantes, objets de notre intérêt.

Les solutions surnageantes, préparées à partir des cultures de souches V et W, sont chauffées à 56° pendant une heure, formolées à 3 p. 1 000, puis concentrées par dialyse à température ordinaire ; les germes sont éliminés autant que possible par deux nouvelles centrifugations à 8 000 t/m, d'une heure chacune. Nous utiliserons ici le terme « substance soluble » pour les préparations que nous décrivons par analogie avec des préparations identiques, décrites dans la littérature et ainsi dénommées.

Préparation des sérums. — Trois injections intraveineuses de doses massives de suspensions bactériennes vivantes, lavées, sont faites au lapin en douze jours.

Les sérums obtenus agglutinent et précipitent avec les suspensions microbiennes ou les antigènes de souches V ou W ; ce fait traduit la présence d'antigènes somatiques O dans les souches Vi. Nous avons préparé ainsi deux sérums anti-V (765-766) et deux sérums anti-W (767-768).

Technique d'hémagglutination. — La sensibilisation des globules s'effectue à la concentration de 2 p. 100 de G. R. et 10 μ g en moyenne de substance soluble par millilitre (exprimée en poids sec) ; l'opération est faite au bain-marie à 37° pendant deux heures. Les G. R. sont ensuite centrifugés et lavés deux fois.

Les sérums anti-V et anti-W sont distribués à raison de 0,2 ml par tube dans une série de petits tubes à fond rond (type tubes de Kahn) et dilués de façon que dans chaque tube la concentration en sérum soit la moitié ou le 1/10 de la concentration du tube précédent. Dans chacun de ces tubes, on ajoute 0,1 ml de G. R. à 1 p. 100 du culot sensibilisés par l'une ou l'autre des préparations.

La lecture des résultats se fait après deux heures à 37° et vingt-quatre heures à 20°.

On note le dernier tube où, après agitation, subsistent des agglutinats macroscopiquement visibles ; on observe que ce tube est généralement suivi de 1 ou 2 tubes, dont le fond hémisphérique est recouvert d'une couche plus ou moins homogène de G. R. correspondant à une agglutination microscopique. Les tubes qui ne présentent pas d'agglutination ont un petit culot rond, homogène, à bord parfaitement circulaire et régulier (fig. 1). Le type d'agglutination observé dans la première moitié des tubes

positifs est analogue aux agglutinations type Middlebrook obtenues avec les substances polysidiques du bacille tuberculeux.

On observe, par la méthode ci-dessus, que les G. R. sensibilisés avec la substance soluble Vi réagissent à la dilution 1/40 000 ou 1/60 000 des sérums anti-Vi (765 et 766), mais ne réagissent pas avec des sérums anti-W (767 et 768). L'agglutination des G. R. sensibilisés avec la substance soluble W, par les mêmes

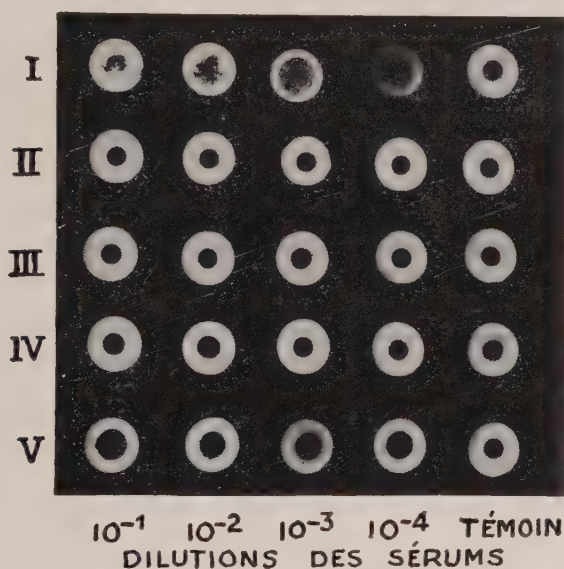


FIG. 1. — Culots d'hémagglutination.

Photographie verticale des fonds des tubes à travers le portoir.

I, G.R. sensibilisés avec un extrait Vi, sérum V; II, mêmes G.R., sérum W; III, G.R. sensibilisés avec un extrait W, sérum V; IV, mêmes G.R., sérum W; V, G.R. sensibilisés avec un extrait de W fait à chaud, sérum W; (+), (+), (+), (+), (-).

sérums W et V, est également nulle (voir figure). Il s'agit donc d'une réaction rigoureusement spécifique.

II. CONDITIONS DE LA RÉACTION ET LIMITES DE SA SPÉCIFICITÉ. —

Nous avons fait varier chaque élément de cette réaction : souche, conditions d'extraction, globules d'espèces animales différentes, concentration de la substance sensibilisante, etc...

1° *Souches microbiennes*. — Les substances solubles préparées à partir des souches connues pour leur teneur en antigène Vi ; Ty₂ ; Vi I ; Watson ; *S. paratyphi* C Vi ; *S. Ballerup*, sensi-

bilisent tous des G. R. de mouton, donnent une hémagglutination à des taux élevés avec un sérum anti-V et une hémagglutination nulle avec un sérum anti-W. Les substances solubles de souches Vi inagglutinables : O 901, H 901 ne sensibilisent pas les G. R. vis-à-vis d'un sérum Vi.

Certaines souches, à partir desquelles on a pu isoler les deux variants V et W sous forme stable ou stabilisée et que nous devons à M. Le Minor, permettent d'écarter toute discussion sur la possibilité d'une réaction due à un élément inconnu de souches hétérogènes. Les souches E 415 et JO 7 sous leur forme W ne donnent pas de produit soluble sensibilisant tandis que les formes V donnent fidèlement cette substance. Les mêmes résultats sont obtenus avec les variants V et W d'une souche d'*Escherichia coli*, stabilisée en présence des bactériophages anti-W et V (1).

2° *Conditions de l'extraction.* — Pour conserver à cette réaction toute sa spécificité, il est nécessaire que l'extraction de la substance soluble soit pratiquée dans des conditions précises.

Les solutions surnageantes des cultures Vi en bouillon et des suspensions recueillies sur gélose sensibilisent les G. R. aussi bien que les solutions surnageantes de suspensions lavées et agitées ; ces dernières offrent de meilleures conditions pour une purification ultérieure.

La réaction pratiquée avec les solutions surnageantes d'une culture de dix jours de la souche Watson ou d'une suspension de culture de vingt-quatre heures agitée pendant dix heures ne perd rien de sa spécificité.

Les extraits obtenus à partir de germes Vi desséchés préalablement à l'acétone, comme le fait Landy pour la préparation de ses vaccins à partir de *Escherichia coli* Vi, donnent une hémagglutination presque aussi spécifique que celle obtenue par action de nos substances solubles. Cependant, il apparaît déjà une légère agglutination dans les premiers tubes d'une série où les G. R., sensibilisés par un extrait Vi, sont mis au contact d'un sérum anti-W de la même espèce microbienne. La réaction n'est donc plus ici aussi spécifique.

Il est aisé, par un chauffage de dix minutes à 90° de suspensions microbiennes Vi (souche Watson), de faire apparaître une hémagglutination avec un sérum anti-W (voir figure). Cette réaction, non spécifique Vi, n'apparaît pas encore à la suite d'un chauffage de dix minutes à 80°.

3° *Sensibilisation des érythrocytes d'espèces animales différentes.* — Les résultats se montrent aussi régulièrement spécifiques, et à des taux aussi élevés, que l'on s'adresse aux érythro-

(1) Nous remercions M. P. Nicolle de cette préparation de bactériophage.

cytes de l'homme, du cheval, du mouton, du chien, de la chèvre, du lapin ou du bœuf.

4° Nous avons cherché à établir la preuve que l'hémagglutination est bien due à la *fixation de la substance Vi* sur les érythrocytes. Preuve indirecte : un extrait brut de la substance Vi, contenant 200 µg de substances sèches par millilitre, est mis en présence de G. R. de mouton, à la concentration de 0,1 ml de culot par millilitre de solution ; on laisse une demi-heure au bain-marie, à 37° et on centrifuge. Ce simple contact des G. R. avec la solution Vi suffit à éliminer la substance spécifique de la solution puisqu'on ne peut plus l'y déceler à l'aide de l'habituelle réaction du disque de précipitation spécifique. Cependant, une légère réaction de précipitation apparaît tardivement, réaction qui, si l'on se réfère à une série de solutions de concentrations décroissantes de substances Vi, équivaldrait à la présence de 10 ou 20 µg de cette substance par millilitre ; 90 p. 100 au moins de la substance Vi ont donc été adsorbés. Un nouveau contact du liquide absorbé avec des G. R. neufs ne modifie pas cette légère réaction tardive.

5° *L'étude des conditions de cette fixation a permis de noter les faits suivants.* — La fixation a lieu en quelques minutes à 37°. Elle est presque nulle à 4°. Le titre d'hémagglutination maximum est déjà obtenu pour une concentration de la substance soluble brute de 2 µg par millilitre de G. R. à 2 p. 100 et la sensibilisation apparaît déjà pour une concentration minimum de 0,3 µg. La capacité maximum de fixation par des G. R. de mouton semble être atteinte pour 50 µg du produit par millilitre de la même suspension d'érythrocytes.

6° Nous avons vérifié, à l'aide de cette réaction, que *le chauffage de la substance soluble Vi* à 100° et la formolisation poussée à 5 p. 100 n'inhibaient en rien sa capacité de sensibiliser les G. R. et à provoquer l'hémagglutination en présence du sérum homologue.

III. DISCUSSION. — La spécificité de la réaction est due à deux ordres de facteurs :

1° *La substance soluble W* s'avère, dans les conditions où nous opérons, incapable de sensibiliser les globules. Ces faits peuvent paraître en contradiction : 1° avec les résultats obtenus en utilisant des antigènes purifiés (et peut-être dégradés) ; 2° avec les résultats de Bier et OEding cités plus haut ; 3° avec ceux de Keogh, North et Warburton obtenus avec des antigènes extraits par le phénol [6].

Ils peuvent s'interpréter de la manière suivante : les antigènes O des formes W, qui sont capables de sensibiliser les globules, sont des antigènes « profonds », ou modifiés au cours de leur

purification, alors que les antigènes plus superficiels des formes W, comme le sont logiquement les « substances solubles », n'ont pas la qualité physique ou les groupements nécessaires pour se fixer. En faveur de ce point de vue milite le fait que seuls les germes dégradés laissent apparaître ce type d'antigène et particulièrement que les substances sensibilisatrices n'apparaissent qu'entre 80° et 90°, température à laquelle éclate la membrane cellulaire des bactéries d'après Salton et Horne [7].

2° La substance soluble Vi des formes V sensibilise les globules à des concentrations très faibles : 0,3 µg d'une préparation non purifiée pour 1 cm³ de G. R. à 2 p. 100 du culot, qui représentent environ 4×10^8 globules par millilitre.

Cette sensibilisation est due à une fixation de la substance Vi sur les globules ; ce fait est démontré par l'analyse des solutions surnageantes de cette fixation, après centrifugation d'un mélange de globules et de l'extrait. On constate, en effet, la disparition de la substance Vi. Une telle fixation n'a pu être démontrée pour la substance soluble W, mais ne peut être exclue. On ne peut donc parler d'une fixation élective de la substance soluble Vi. Par contre, l'héماغglutination est élective puisque les G. R. sensibilisés par elle n'agglutinent en présence d'un mélange de sérums anti-W et anti-V que sous l'action des seuls anticorps Vi.

En ne considérant que les « substances solubles », celles qui, *a priori*, sont susceptibles d'entrer en contact les premières avec les molécules libres ou les surfaces cellulaires d'un hôte éventuel, il y a une analogie avec les extraits identiques de Keogh, North et Warburton obtenus à partir de *Haemophilus influenzae*. Ces auteurs pensent que les anticorps, agglutinant les globules sensibilisés de la même manière, sont des anti-polyosides spécifiques.

L'étude des propriétés immunochimiques des substances solubles fera l'objet d'un autre travail.

CONCLUSIONS. — 1° Des globules rouges sensibilisés avec « la substance soluble » de souches Vi (solution surnageante de culture en bouillon ou de lavage de culture sur gélose, obtenue à partir de germes non dégradés) sont agglutinés électivement par des immunosérums anti-Vi, même en présence d'immunosérum anti-O.

2° Cette technique permet d'obtenir une héماغglutination Vi spécifique, de titre élevé avec des quantités minimales d'extrait sensibilisant. Elle constitue donc une méthode d'étude précieuse pour les immunologistes.

3° Les conditions de fidélité de la réaction sont étudiées et différentes variables introduites.

4° A considérer la facilité avec laquelle la « substance soluble Vi » se fixe sur les hématies, il n'est pas exclu que celle-ci joue un rôle dans la virulence éberthienne.

Nous remercions de ses précieux avis M. P. Grabar, avec qui nous poursuivons l'étude immuno-chimique de l'antigène Vi. Nous remercions également M. Le Minor pour le choix parfois délicat des souches étudiées et M. R. Lamy, qui nous a permis d'utiliser un matériel globulaire varié.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. MIDDLEBROOK et R. J. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [2] O. BIER. *Ces Annales*, 1951, **81**, 650.
- [3] M. LANDY (communication personnelle).
- [4] J. SPAUN. *Acta pathol.*, 1951, **29**, 416.
- [5] L. et S. LE MINOR et J. GRABAR. *Ces Annales*, 1952 (sous presse).
- [6] E. V. KEOGH, E. A. NORTH et M. F. WARBURTON. *Nature*, 1948, **161**, 687.
- [7] M. R. J. SALTON et R. W. HORNE. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 19.

LE LAIT PEUT-IL TRANSMETTRE LES MALADIES ANAÉROBIES?

par A.-R. PRÉVOT et H. TOUVENOT.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Les méthodes classiques d'analyse bactériologique du lait et des produits laitiers visent avant tout à détecter qualitativement et numériquement les bactéries aérobies strictes ou facultatives.

La mise en évidence récente par le Service de Contrôle de l'Armée et par notre laboratoire de *Pl. tetani* dans une boîte de fromage fondu a brusquement posé le problème du contrôle des anaérobies stricts. Une Commission de bactériologistes et de techniciens étudie actuellement la mise au point de ce contrôle. Toutefois, il était légitime de se demander si le lait peut transmettre les maladies anaérobies et nous avons voulu répondre à cette question par une expérimentation aussi complète que possible sur l'animal.

Nous avons limité cette expérimentation à trois groupes de maladies anaérobies : les gangrènes, le tétanos, les botulismes.

A priori, la voie d'introduction entérale semblait la seule intéressante. Mais comme, à notre connaissance, il n'existe aucune preuve du pouvoir pathogène parentéral des cultures sur lait des anaérobies, nous avons voulu combler cette lacune.

Ainsi, les 12 anaérobies pathogènes choisis pour nos recherches (6 gangréneux, 1 tétanique, 5 botuliques) ont-ils été introduits chez le cobaye ou la souris par les voies entérale et parentérale. Pour cette dernière, aucune difficulté. Pour la voie *per os*, il suffit d'affamer et d'assoiffer les cobayes ou les souris pendant vingt-quatre heures, puis de leur présenter un repas composé de son et d'avoine mélangés à un tube de culture sur lait de l'anaérobie en question. Les premières ingestions sont parfois un peu difficiles, mais les animaux s'habituent au goût et à l'odeur désagréables des anaérobies et finissent par s'en nourrir.

Nous exposerons les résultats par groupes nosologiques.

I. — SÉRIE GANGRÉNEUSE.

A. VOIE PARENTÉRALE. — Les cultures de dix-huit à vingt-quatre heures sur lait complet de *W. perfringens*, *Cl. septicum*,

Cl. chauvoei, *Cl. œdematiens*, *Cl. histolyticum* et *Cl. sordellii* ont été injectées à 6 cobayes.

a) *Welchia perfringens*. — Souche Lechien.

Le cobaye 99/60 reçoit 1 cm³ dans le muscle. Il meurt en dix-huit heures. A l'autopsie, lésions caractéristiques du phlegmon gazeux hémorragique, très intenses, extensives, très hémolytiques avec une cavité gazeuse de très grande taille.

Souche « Huet » : le cobaye 99/62 reçoit 1 cm³ dans le muscle et meurt en vingt-quatre heures avec le même tableau interne.

b) *Cl. septicum*. — Souche 650.

Le cobaye 99/58 reçoit 1 cm³ dans le muscle et meurt en vingt heures, avec des lésions intenses et caractéristiques d'œdème malin gazeux.

c) *Cl. chauvoei*. — Souche Aynaud.

Le cobaye 99/77 reçoit 1 cm³ dans le muscle et meurt en quarante-huit heures avec des lésions étendues de charbon symptomatique.

d) *Cl. œdematiens*. — Souche Delhomme.

Le cobaye 99/65 reçoit 1 cm³ dans le muscle et meurt en vingt-quatre heures avec les lésions caractéristiques de l'œdème gélatineux rosé.

e) *Cl. histolyticum*. — Souche « chevaux ».

Le cobaye 99/63 reçoit 1 cm³ dans le muscle et meurt en vingt heures avec des lésions caractéristiques de l'histolysé ni gazeuse ni putride.

f) *Cl. sordellii*. — Souche 82.

Le cobaye 99/59 reçoit 1 cm³ dans le muscle et meurt en vingt heures avec des lésions intenses de gangrène putride, œdémateuse et hémolytique.

Ainsi, le lait peut transmettre à l'animal les 6 variétés de gangrène par voie parentérale. Ce résultat, qu'il était logique de prévoir, mais qui n'avait jamais été établi, nous a obligés à rechercher si les toxines gangréneuses pouvaient se produire dans le lait. Cette recherche a été limitée aux souches 741 et « Huet » de *W. perfringens* dont les toxines n'avaient pas pu être obtenues sur bouillon VF, malgré la virulence très nette de ces souches.

Après vingt-quatre heures de culture sur lait, le petit-lait, exsudé de la coagulation spongieuse habituelle, est centrifugé et injecté à la souris par voie veineuse. La dose de 0,5 cm³ de lactosérum de chacune de ces souches se montre très toxique, les souris mourant respectivement en huit minutes (souche « Huet ») et trente minutes (souche 741).

Ainsi, les toxines *perfringens* se forment plus activement sur lait que sur bouillon.

B. VOIE ENTÉRALE. — a) *W. perfringens*. — Souche Lechien.

Le cobaye 27/3 ingère 2 repas infectants (correspondant à deux tubes de lait). Il meurt en quarante-huit heures, après le deuxième repas. On observe une ophtalmie purulente, une hémorragie vaginale et du météorisme abdominal. A l'autopsie, on constate une entérotoxémie se manifestant par une hyperhémie intense de la partie terminale du grêle, un estomac paralysé et dilaté par les gaz dont la muqueuse externe porte plus de 100 petites hémorragies pariétales allant de 1 mm à 5 mm de diamètre, une rétention biliaire très marquée et une congestion générale des viscères. La culture du contenu de l'estomac révèle le mélange de *W. perfringens* avec des aérobies et celle du contenu de l'intestin grêle, *W. perfringens* à l'état pur.

Ainsi, le lait infecté par *W. perfringens* peut conférer rapidement, par ingestion à l'animal, l'entérotoxémie mortelle correspondante.

b) *Cl. septicum*. — Souche 650.

Le cobaye 29/3 ingère 6 repas infectants. Il tolère bien en apparence les 4 premiers, présente des signes morbides à partir du cinquième et meurt après le sixième, soit quatre jours après le début de l'expérience. Extérieurement, on observe une ophtalmie purulente et du météorisme abdominal. A l'autopsie, on constate ici encore une entérotoxémie typique se manifestant par une hyperhémie intestinale intense, une hépatite marquée (avec foie feuille morte), un estomac paralysé et gonflé par les gaz avec hyperhémie. Du contenu stomacal, on isole *Cl. septicum* en culture impure et du contenu de l'intestin grêle une culture pure de *Cl. septicum*.

En conséquence, avec *Cl. septicum*, il faut deux fois plus de lait infectieux qu'avec *W. perfringens*, ce qui correspond aux données épidémiologiques des entérotoxémies naturelles.

c) *Cl. chauvoei*. — Souche Aynaud.

Le cobaye 31/3 ingère 4 repas infectants et meurt le cinquième jour. L'examen du cadavre donne un tableau calqué sur le précédent : entérotoxémie avec hyperhémie noirâtre de tous les viscères. Culture impure de *Cl. chauvoei* dans l'estomac et dans l'intestin grêle.

Le pouvoir pathogène du lait infecté par *Cl. chauvoei* est donc sensiblement le même que celui de *Cl. septicum*.

d) *Cl. œdematiens*. — Souche Delhomme.

Cobaye 31/52. Il a fallu 10 repas infectants pour amener la mort au huitième jour. A l'autopsie, on constate une entérotoxémie ; une anse intestinale est hypertrophiée et congestionnée, mais on ne retrouve l'anaérobie ni dans son contenu ni dans le foie. La reprise du germe dans les myosites à *Cl. œdematiens* est

souvent négative ; les viscérites semblent donc se comporter de même.

e) *Cl. histolyticum*. — Souche « chevaux ».

Cobaye 31/35. Il a fallu 6 repas infectants pour amener la mort au quatrième jour. A l'autopsie, on ne constate aucune lésion spécifique, mais simplement une congestion légère de tous les viscères. Dans l'intestin grêle, on retrouve *Cl. histolyticum* en culture mixte.

f) *Cl. sordellii*. — Souche 82.

Cobaye 44/52. Il a fallu 16 repas infectants pour amener la mort en huit jours. A l'autopsie, on constate une entérotoxémie marquée avec hyperhémie et météorisme. On ne retrouve pas le germe dans l'intestin.

Ainsi, fait paradoxal, c'est le germe anaérobie gangréneux le plus toxigène qui est le moins infectieux, par voie entérale, alors que c'est le moins toxigène qui est le plus infectieux par cette voie. Il semble donc que le pouvoir pathogène, par voie entérale, des anaérobies gangréneux cultivés sur lait soit surtout en rapport avec l'affinité de leur toxine pour le tube digestif.

II. — TÉTANOS.

A. VOIE PARENTÉRALE. — Si paradoxal que cela puisse paraître, il est difficile d'obtenir la toxine tétanique sur lait. Plusieurs cultures de vingt-quatre heures, quarante-huit heures et trois jours de la souche L 42 sur lait n'ont donné aucune trace de toxine et les animaux injectés n'ont pas présenté de tétanos.

Une souche récente 743, provenant d'un tétanos mortel survenu à la Martinique, a donné après dix-huit jours d'incubation une culture tétanigène : une souris injectée avec 0,5 cm³ sous la peau est morte en quarante-huit heures d'un tétanos généralisé.

Donc, la production du tétanos, expérimental par les cultures sur lait, est difficile, irrégulière et rare.

B. VOIE ENTÉRALE. — Les cobayes et les souris nourris par des cultures de tétanos (442 et 743) sur lait n'ont présenté aucun phénomène tétanique et ont survécu.

Ainsi le tétanos ne se transmet pas par le lait par voie entérale.

III. — SÉRIE BOTULIQUE.

A. VOIE PARENTÉRALE. — a) *Cl. botulinum* A. — Souche Legroux.

Cobaye 14/52 : 1 cm³ de culture de quarante-huit heures sur lait par voie sous-cutanée. Meurt en vingt heures.

Botulisme typique avec lésions caractéristiques (paralyse de l'estomac avec digestion de la paroi).

b) *Cl. botulinum* B. — Souche « petits pois ».

Cobaye 15/52 : 1 cm³ de culture de quarante-huit heures sur lait par voie sous-cutanée. Meurt en vingt heures d'un botulisme typique avec digestion de la paroi stomacale.

c) *Cl. botulinum* C. — Souche sud-africaine.

Souris *d. v.* : 0,5 cm³ sous-cutané d'une culture de dix-huit jours sur lait. Meurt en sept heures de paralysie flasque botulique.

d) *Cl. botulinum* D. — Souche 468.

Souris *p. a. d. v.* : 0,5 cm³ sous-cutané d'une culture de dix-huit jours sur lait. Meurt en sept heures de paralysie flasque botulique.

e) *Cl. botulinum* E. — Souche perche.

Souris *p. a. g. v.* : 0,5 cm³ sous-cutané d'une culture de dix-huit jours sur lait. Meurt en quinze heures de paralysie flasque botulique.

Donc, le lait peut transmettre les 5 types de botulisme par voie sous-cutanée.

B. VOIE ENTÉRALE. — a) *Cl. botulinum* A. — Souche Legroux.

Un seul repas infectant suffit pour tuer le cobaye en dix-huit à vingt heures, par botulisme typique et lésions caractéristiques (digestion des parois stomacale et intestinale).

b) *Cl. botulinum* B. — Souche « petits pois ».

Un seul repas infectant tue le cobaye en vingt heures, par botulisme typique et digestion de l'estomac.

c) *Cl. botulinum* C. — Souche sud-africaine.

Un seul repas infectant tue le cobaye en vingt heures, par botulisme typique et digestion de l'estomac.

d) *Cl. botulinum* D. — Souche 468.

Un seul repas infectant (culture de dix-huit jours sur lait) tue une souris en vingt-quatre heures ; une autre souris ne meurt qu'après cinq jours.

e) *Cl. botulinum* E. — Souche perche.

Un seul repas infectant (culture de dix-huit jours sur lait) tue les 2 souris en expérience en quarante-huit heures.

CONCLUSIONS.

1° Par voie parentérale intramusculaire, le lait peut transmettre au cobaye les 6 types de myosite gangréneuse, habituellement provoqués par les cultures sur bouillon de *W. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. œdematiens*, *Cl. histolyticum* et *Cl. sordellii*.

2° Par voie entérale, les cultures sur lait des 6 anaérobies

gangréneux ci-dessus provoquent les viscérites correspondantes.

3° Par voie parentérale, le lait ne transmet le tétanos que de façon irrégulière.

4° Par voie entérale, le lait ne transmet pas le tétanos.

5° Par voie parentérale sous-cutanée, le lait transmet au cobaye ou à la souris les 5 types de botulisme A, B, C, D et E.

6° Par voie entérale, le lait transmet au cobaye et à la souris les 5 types de botulisme.

7° Le contrôle bactériologique du lait doit donc comporter, s'il veut être complet, la détection des anaérobies stricts pathogènes des séries gangréneuse et botulique.

RECHERCHES
SUR LA REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE
DES ACTINOMYCOSES
A *ACTINOBACTERIUM BAUDETII*
ET *ACTINOBACTERIUM CELLULITIS*

par C. MAZUREK, P. TARDIEUX et A.-R. PRÉVOT.

[*Institut Pasteur, Service des Anaérobies*]. (1)

Introduction.

Les actinomycoses humaines et animales posent de nombreux problèmes dont les principaux, relatifs à l'étiologie, à la pathogénie, à la reproduction expérimentale et à la thérapeutique, sont restés longtemps très confus. Toutefois, les travaux de ces dix dernières années ont élucidé quelques points d'étiologie et de pathogénie.

Tout d'abord, le nom d'actinomycose doit maintenant être strictement réservé aux suppurations aiguës, subaiguës et chroniques aboutissant habituellement à la formation de grains blancs (ou jaunes) et qui sont provoqués par des actinomycètes : *Actinomyces* aérobies et *Actinobacterium* anaérobies.

Ceci élimine les infections qui, cliniquement, se présentent comme des actinomycoses, mais qui, étant provoquées par des espèces anaérobies des genres *Corynebacterium*, *Ramibacterium* ou *Fusocillus*, ne sont en réalité que des pseudo-actinomycoses comme l'ont montré Prévot, Béal et Tardieux [1] pour les cellulites jugales et cervico-faciales, et Prévot, Goret, Joubert, Tardieux et Aladame [2] pour la fusocilliose du chat.

Il résulte de cette définition que l'on ne peut plus considérer l'actinomycose vraie comme une maladie à étiologie unique puisque, à côté de l'actinomycose causée par *Actinomyces bovis*, aérobie facultatif, nous connaissons maintenant les actinomycoses causées par les 4 espèces anaérobies du genre *Actinobacterium* :

(1) Tous les examens histo-pathologiques qui figurent dans ce travail ont été réalisés par le Dr Bablet, chef du Service d'Anatomo-pathologie, que nous remercions très vivement pour sa collaboration.

A. israëli, *A. meyeri*, *A. abcessus* et *A. cellulitis* [3, 4, 5, 6, 7], auxquelles vient s'ajouter l'actinomycose canine causée par une espèce microaérophile, *Actinobacterium baudeti* [8, 9, 10].

Du point de vue de la reproduction expérimentale, les auteurs se sont heurtés à de si nombreuses difficultés que jusqu'en 1950 aucun résultat concluant ne peut être retenu. E. R. Brygoo [11] a dressé le bilan de ces travaux, pour la plupart négatifs, et a exposé ses propres recherches : les injections répétées d'*A. israëli*, d'*A. abcessus* et d'*A. cellulitis* au cynocéphale par diverses voies n'ont donné aucun résultat.

Par contre, E. Meyer et Verges en 1950 [12], puis R. S. Geister et E. Meyer en 1951 [13] ont réussi à reproduire régulièrement chez la souris une actinomycose en ajoutant aux cultures d'*Actinomyces bovis* de la mucine gastrique. Ces deux derniers auteurs ont pu ainsi déterminer la dose infectieuse minima et prouver que l'auréomycine et la pénicilline sont efficaces pour la prophylaxie et la thérapeutique de la maladie expérimentale. Toutefois, il faut remarquer que leurs souches, étiquetées *A. bovis*, sont anaérobies. Or, les descriptions initiales d'*A. bovis* (Harz, Macé, etc...) assignent très nettement à cet actinomycète la qualité d'aérobie facultatif. Ce n'est que longtemps après qu'on a attribué en Amérique la qualité anaérobie strict à ce germe, ce qui est une erreur qui tend maintenant à faire confondre *Actinomyces bovis* et *Actinobacterium israëli*. Or, ces deux germes ne sont pas identiques puisque l'un est aérobie et l'autre anaérobie. On ne peut donc pas savoir quelle actinomycose Meyer et Verges, puis Geister et Meyer ont reproduite chez la souris et guérie par ces deux antibiotiques.

Etant donné l'importance de cette question, puisque c'est par la maladie expérimentale qu'on comprendra enfin la pathogénie des actinomycoses et qu'on trouvera leur traitement, nous avons repris ces recherches sur une nouvelle base.

Partie expérimentale.

Nous avons utilisé, pour ces expériences, les mêmes souches d'*A. baudeti* et d'*A. cellulitis* dont nous nous sommes servis pour des recherches antérieures [10].

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES : CULTURES PURES.

a) *A. baudeti*.

EXPÉRIENCE I. — Des cultures de *A. baudeti* en bouillon VF additionné d'extrait de cervelle ont été injectées par voies sous-cutanée et intravértréonéale à des souris. Chaque animal a reçu une

injection unique, soit de 0,5 cm³, soit de 1 cm³. Toutes les souris ont succombé en huit à quinze jours, mais aucune n'a présenté les lésions spécifiques de l'actinomycose.

EXPÉRIENCE II. — Douze cobayes reçoivent une injection de 1 ou 2 cm³ de la même culture par les voies sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire. Tous meurent en dix à quinze jours mais sans présenter de lésion spécifique.

EXPÉRIENCE III. — Deux lapins reçoivent, l'un 2 cm³ de culture en gélose par voie intrapéritonéale, l'autre 10 cm³ de culture en bouillon VF par voie sous-cutanée. Aucune lésion d'actinomycose.

EXPÉRIENCE IV. — Deux chats reçoivent une injection unique de culture en bouillon par voie intrapéritonéale et survivent sans aucun symptôme.

EXPÉRIENCE V. — Un chien reçoit deux injections de 10 cm³ de culture en bouillon VF par voie intrapéritonéale à un mois d'intervalle et ne présente aucun symptôme. Un autre reçoit les mêmes doses par voie sous-cutanée et présente au lieu d'injection un abcès banal à pyogènes qui guérit spontanément.

EXPÉRIENCE VI. — Un singe reçoit deux injections de 10 cm³ à un mois d'intervalle par voie intrapéritonéale. Il survit sans aucun symptôme.

b) *A. cellulitis*.

EXPÉRIENCE VII. — Des souris ont reçu par les diverses voies des injections uniques de culture d'*A. cellulitis* sans aucun résultat.

EXPÉRIENCE VIII. — Des cobayes traités de la même manière n'ont présenté aucun symptôme.

EXPÉRIENCE IX. — Deux chiens ont reçu 5 cm³ de culture de quatre jours d'*A. cellulitis*, l'un par voie intrapéritonéale, l'autre par voie sous-cutanée sans résultat. (Ce dernier a présenté un abcès fistuleux à *W. perfringens* qui a guéri spontanément). L'autre a subi un affaiblissement et un amaigrissement considérable.

CONCLUSION DES EXPÉRIENCES I A IX. — Ni les cultures pures d'*A. baudeti*, ni celles d'*A. cellulitis* ne sont capables de conférer aux divers animaux l'actinomycose expérimentale.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES : ASSOCIATIONS.

a) *A. baudeti*.

Les résultats obtenus avec les cultures pures étant négatifs, nous avons essayé de reproduire l'actinomycose expérimentale par les associations d'*A. baudeti* et d'*A. cellulitis* avec des anaérobies de la flore endogène buccale, puisque l'actinomycose spontanée prend son point de départ dans la bouche.

EXPÉRIENCE X. — Association *A. baudeti* + *Veillonella parvula*.

Des souris et des cobayes reçoivent des injections de cette association par les diverses voies sans résultat.

Un cynocéphale traité de la même façon présente un œdème local qui se transforme lentement en tuméfaction dure qui se résout peu à peu.

EXPÉRIENCE XI. — Association *A. baudeti* + *Fusocillus girans*.

Des souris et des cobayes reçoivent des injections de cette association par les diverses voies sans résultat.

Un lapin qui a reçu la même association a présenté une tuméfaction locale qui s'est transformée en abcès. L'incision a libéré un pus amicrobien.

Deux chats ont reçu cette association, l'un par voie intra-péritonéale, l'autre par voie sous-cutanée. Le premier n'a présenté qu'un affaiblissement momentané de l'état général, l'autre a présenté un abcès qui s'est fistulisé et a guéri spontanément.

Un cynocéphale traité par la même association présente un œdème local qui se résout peu à peu.

EXPÉRIENCE XII. — Association *A. baudeti* + *Staphylococcus anaerobius*.

Deux chats ont reçu des injections de cette association sans résultat.

Un chien traité de même n'a rien présenté d'anormal.

Un cynocéphale traité de même a présenté un œdème local qui s'est résorbé progressivement.

EXPÉRIENCE XIII. — Association *A. baudeti* + *Staphylococcus anaerobius* + *V. parvula* + *F. fusiformis*.

Un singe (*Maccacus rhesus*) reçoit cette association, d'abord dans la région sous-maxillaire, puis dans la région abdominale et présente une tuméfaction abdominale. Incisée, elle s'est présentée comme un abcès enkysté à pus lié contenant surtout *V. parvula* mais pas d'*A. baudeti*. L'examen histologique a montré une réaction histiocytaire et endothéliale dans un tissu conjonctif très œdématié.

b) *A. cellulitis*.

EXPÉRIENCE XIV. — Association *A. cellulitis* + *F. girans*.

Deux chats ont reçu 5 cm³ de cette association par voie intrapéritonéale et n'ont présenté aucun symptôme.

Deux autres chats ont reçu 5 cm³ de cette association par voie sous-cutanée ; ils ont présenté un léger amaigrissement et des réactions locales avec formation d'un abcès à pyogènes qui a guéri spontanément en quatorze semaines.

CONCLUSION DES EXPÉRIENCES X A XIV. — Les associations de *A. baudeti* et de *A. cellulitis* avec des pyogènes anaérobies de la flore endogène buccale reproduisent assez facilement des supurations anaérobies mais non l'actinomycose expérimentale.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES : EMPLOI DE LA MUCINE.

Devant cette impossibilité de reproduire l'actinomycose avec des cultures pures ou associées, nous avons pensé à additionner les cultures d'*Actinobacterium* d'une solution de mucine.

Nous avons utilisé des solutions à 5 p. 100. On sait, en effet, que Nungester, Wolf et Jourdonais en 1932 [14] ont augmenté la virulence du streptocoque et du pneumocoque en injectant avec eux de la mucine gastrique de porc, et que Gale et Elberg en 1952 [15] ont augmenté la virulence de diverses bactéries pour la souris par l'addition de mucine gastrique homologue. Une culture d'*Actinobacterium* de trois à cinq jours est centrifugée et le culot microbien est repris dans la solution de mucine gastrique de porc.

EXPÉRIENCE XV. — *A. baudeti* + mucine, sur cobaye.

Les trois premiers cobayes injectés sont morts en dix à quinze jours après avoir reçu deux injections de 2 cm³ à sept jours d'intervalle. A l'autopsie, exsudat grumeleux dans la cavité péritonéale, qui tapisse le mésentère et la surface du foie de grains blanchâtres. L'examen microscopique de ces grains montre une prédominance d'*A. baudeti* avec des cocci et des bâtonnets Gram-négatifs. Sur les 3 cobayes suivants, 2 sont morts en quinze et vingt-trois jours. Même tableau anatomo-pathologique. Du pus de l'un d'eux on réisole *A. baudeti* en culture pure (fig. 1 et 2).

L'examen histologique des pièces prélevées montre un abrasement de l'endothélium péritonéal avec exsudat polynucléaire abondant et réaction histiocyttaire intense ; dans la profondeur, infiltration interstitielle des couches musculaires sans dégénérescence notable des fibres. Stase veineuse hépatique ; infiltration des espaces portes ; réaction endothéliale ; hyperplasie nucléaire.

Le troisième cobaye est mort en trois semaines, après la dernière injection. A l'autopsie, abcès circonscrit de la paroi abdominale à pus crémeux et granuleux. Pas de microbe à l'examen direct.

La troisième série de cobayes a donné 1 mort en sept jours

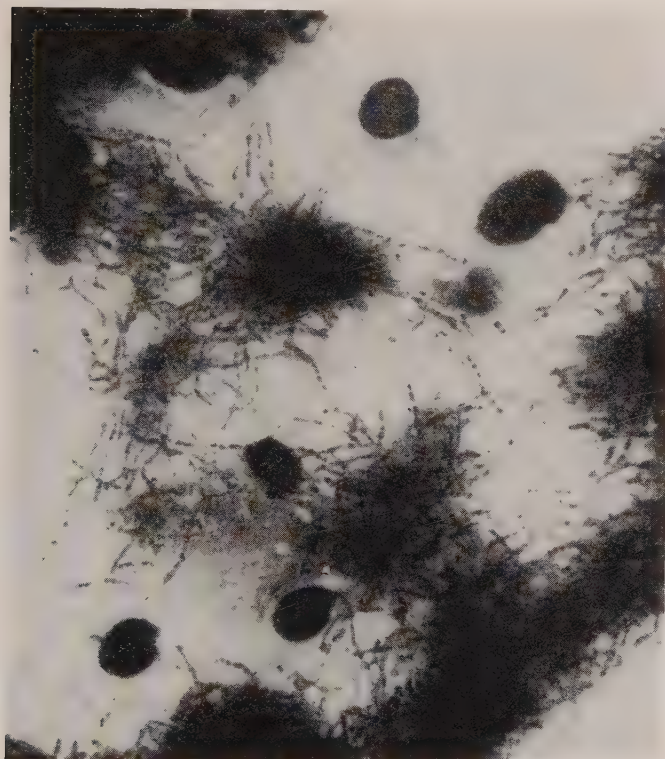


FIG. 1. — *Actinobacterium baudeti*.

Granule prélevé sur le foie d'un cobaye mort d'actinomycose expérimentale.
Gross. : $\times 4\ 300$. (Service de photo-micrographie de l'Institut Pasteur.)

et 1 en vingt-trois jours. Pus crémeux à phagocytes nombreux.

Dans la quatrième série, les cobayes n'ont reçu qu'une seule injection par semaine. L'un des cobayes mourut huit jours après la première injection d'une péritonite purulente. Il s'agit d'un pus liquide où flottent des grumeaux. Le péritoine et le mésentère sont tapissés de ces grains blanchâtres. A l'examen microscopique direct, on constate de nombreux *Actinobacterium* autour de cellules plus ou moins altérées. Un autre cobaye mourut

dix-sept jours après la première injection avec le même tableau nécropsique.

Dans la cinquième série (une injection hebdomadaire), 2 cobayes meurent rapidement avec le même tableau que ci-dessus. Un troisième, mort en trois semaines, présentait une péritonite fibrino-purulente, de nombreuses adhérences entre les anses



FIG. 2. — *Actinobacterium baudeti*.

Frottis d'un grain blanc d'un pus péritonéal d'actinomycose expérimentale.
Gross. : $\times 1\ 300$. (Service de photo-micrographie de l'Institut Pasteur.)

intestinales et les autres viscères. L'épiploon, le mésentère, la surface du foie sont tapissés de grains blancs. Ceux-ci, examinés au microscope, se révèlent constitués par des cellules nécrosées et des amas d'*A. baudeti*.

L'examen histologique a montré une congestion marquée du parenchyme hépatique avec dégénérescence périphérique, œdème intercellulaire, pycnose, cytolysse, infiltration inflammatoire sub-aiguë des espaces portes. La cavité péritonéale est occupée par une infiltration à polynucléaires et un exsudat fibrineux. Le pancréas est sclérosé ; légère hyperplasie des îlots de Langerhans,

nombreuses bactéries libres ou intracellulaires, dont la coloration par le Gram montre la nature actinomycétienne.

EXPÉRIENCE XVI. — *A. baudeti* + mucine sur singes.

Deux cynocéphales reçoivent par voie intrapéritonéale 10 cm³ de la suspension mucique une fois par semaine.

Un *M. rhesus* en reçoit 5 cm³ une fois par semaine.

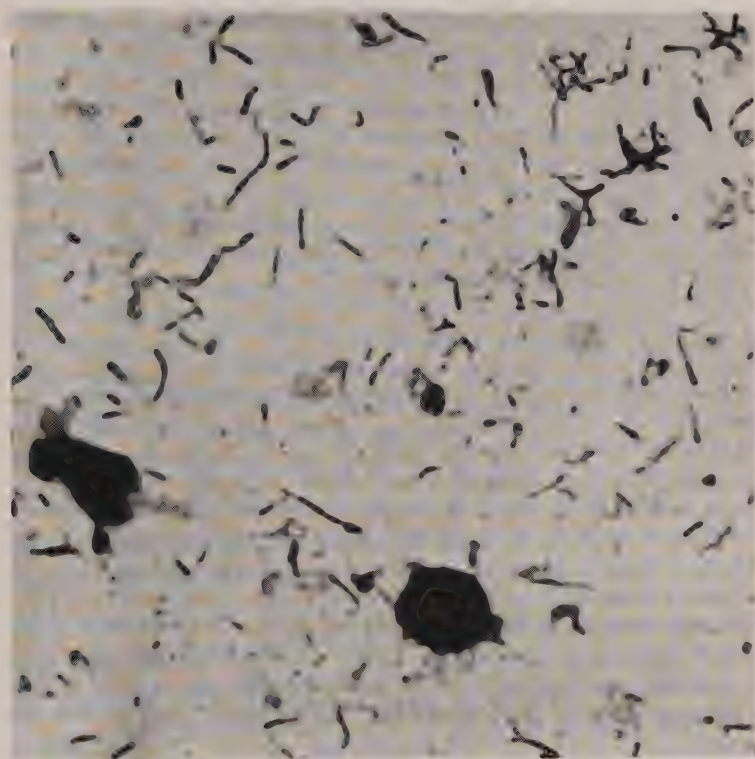


FIG. 3. — *Actinobacterium cellulitis*.

Dans les granules d'actinomycose expérimentale. Gross. : $\times 4\ 360$. (Service de photo-micrographie de l'Institut Pasteur.)

L'un des cynocéphales présente un abcès fistuleux qui, ponctionné, donna un pus crémeux à cellules altérées sans grains blancs, où l'*Actinobacterium* ne fut pas retrouvé. L'autre cynocéphale et le *M. rhesus* tolèrent bien ces injections.

EXPÉRIENCE XVII. — *A. cellulitis* + mucine sur cobaye.

Trois cobayes reçoivent 1 cm³ du mélange deux fois par

semaine. L'un meurt en quatorze jours après la première injection. Le péritoine est le siège de suppurations circonscrites constituées par des amas de cellules altérées avec prolifération abondante d'*A. cellulitis*. L'autre meurt en quinze jours : suppurations péritonéales à grains blancs ; chaque grain est constitué par des amas de cellules altérées et de corps microbiens semblables à *A. cellulitis* (fig. 3).

Le troisième meurt en deux mois (onze jours après la dernière injection) : épaississement du péritoine, adhérences ; formations granuleuses dont on isole *A. cellulitis* en culture pure.

Si on réduit le nombre des injections à une par semaine, on peut reproduire une actinomycose expérimentale du même type anatomo-pathologique (suppurations à grains blancs), mais moins rapidement mortelle ; dans ces derniers cas, les métastases pulmonaires apparaissent. L'examen histologique du péritoine montre une nappe de polynucléaires : épaississement de la sous-séreuse par dépôt collagène, infiltration histiocytaire, œdème et infiltration légère de la musculuse.

EXPÉRIENCE XVIII. — Témoins :

Pour comprendre le mécanisme de l'action de la mucine dans l'actinomycose expérimentale, nous avons injecté 2 cobayes avec la solution de mucine seulement. L'un meurt en deux mois ; à l'autopsie, on constate un épaississement du péritoine et une dégénérescence hépatique : foie friable d'aspect feuille morte. A l'examen histologique : stéatose, et nécrose médiane et centrolobulaire ; congestion et dilatation des capillaires ; œdème hémorragique et infiltration histiocytaire des espaces portes. Plage de congestion dans le poumon. L'autre cobaye est mort en sept semaines sans autre lésion qu'une congestion hépatique.

Ainsi, c'est à la faveur de l'état congestif et nécrotique dû à la mucine que les anaérobies actinomycogènes se développent dans l'organisme et provoquent les lésions spécifiques de l'actinomycose.

CONCLUSION DES EXPÉRIENCES XV A XVIII. — En associant *A. baudeti* et *A. cellulitis* avec la mucine, on reproduit une actinomycose expérimentale subaiguë mortelle. Celle-ci se constitue à la faveur de l'action congestive et nécrotique propre à la mucine.

Conclusions générales.

1° Quand on cherche à reproduire l'actinomycose expérimentale avec des cultures pures d'*Actinobacterium baudeti* ou d'*A. cellulitis* quels que soient la voie d'introduction, l'espèce

animale, la quantité de culture et le rythme des injections, on échoue presque toujours.

2° En associant ces deux anaérobies avec les autres anaérobies pyogènes de la cavité buccale de l'homme, on obtient presque toujours des suppurations mortelles chez les animaux d'expérience, mais celles-ci n'ont pas le caractère spécifique de l'actinomycose et on n'y retrouve que les pyogènes associés.

3° Au contraire, en associant ces deux anaérobies avec la mucine, à la faveur de l'action propre de celle-ci (congestive et nécrosante), les actinomycogènes développent une action spécifique chez l'animal d'expérience, cobaye, souris et lapin de préférence (singé exclus) et ceux-ci présentent les lésions caractéristiques de l'actinomycose : pus à grains riziformes, congestion et nécrose des tissus environnants, mort en un temps variable suivant la quantité injectée. Il est remarquable que, dans ce syndrome subaigu, les lésions spécifiques contrôlables restent localisées au lieu d'injection, c'est-à-dire à la cavité péritonéale. Malgré l'importance des doses injectées nous n'avons vu qu'une fois une métastase pulmonaire. Le foie, la rate, les reins, pourtant tapissés de grains actinomycosiques, ne présentaient que des lésions histologiques d'inflammation banale. Ceci montre, à notre sens, que l'actinomycose est une maladie essentiellement localisée sans tendance à la dissémination.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT, G.-J. BÉAL et P. TARDIEU. *Ces Annales*, 1950, **79**, 763.
- [2] A.-R. PRÉVOT, P. GORET, L. JOUBERT, P. TARDIEUX et N. ALADAME. *Ces Annales*, 1951, **81**, 85.
- [3] R. VINZENT et H. TATAKI. *Ces Annales*, 1951, **81**, 92.
- [4] G. LACRONIQUE, A.-R. PRÉVOT, G.-J. BÉAL et M. GOUDAERT. *Rev. de Stomat.*, 1948, **49**, 421.
- [5] M. RAYNAUD, L.-A. ROBIN, P. DE LAJUDIE. *Ces Annales*, 1948, **74**, 333.
- [6] J. LINHARD. *Ces Annales*, 1949, **76**, 478.
- [7] LATTÈS, GIRALDY, ROUSSEAU, A.-R. PRÉVOT et J. LINHARD. *Rev. de Stomat.*, 1949, **50**, 539.
- [8] E. BAUDET. *Ann. Parasit.*, 1934, **12**, 296.
- [9] A. BRION. *Rev. Méd. Vét.*, 1939, 91-92 et 1942, 94.
- [10] A.-R. PRÉVOT, C. MAZUREK et P. TARDIEUX. *Ces Annales*, 1951, **81**, 173.
- [11] E. R. BRIGOO. *Ces Annales*, 1950, **78**, 696.
- [12] E. MEYER et P. VERGES. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **36**, 667.
- [13] R. S. GEISTER et E. MEYER. *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **38**, 101.
- [14] W. J. NUNGESTER, A. A. WOLF et L. F. JOURDONAIS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1932, **30**, 120.
- [15] D. GALE et S. ELBERG. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1952, **79**, 32.

ACTION INHIBITRICE DES EXTRAITS AQUEUX DE TOURBE SUR LA CROISSANCE DES GERMES DU SOL

par J. POCHON et H. DE BARJAC (*).

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du sol.)

Les tourbes sont, par définition, des terres peu évoluées où les fonctions physiologiques des principaux groupes bactériens seraient soit considérablement ralenties (ex. humification), soit même supprimées (ex. fixation de N atmosphérique par les *Azotobacter* en aérobiose). Il était donc normal de rechercher si les conditions offertes par le « milieu tourbe » à la microflore d'un sol normal se révélaient défavorables, en d'autres termes, de rechercher si l'on pouvait mettre en évidence un pouvoir inhibiteur. Comment représenter au laboratoire ce « milieu tourbe » ? Il nous a paru logique d'effectuer nos premières expériences sur des extraits aqueux de tourbe préparés soit à froid, soit à chaud. On sait, en effet, que les extraits aqueux de terre permettent parfaitement bien la croissance des germes telluriques. On pouvait dès lors espérer que, s'il existait dans les tourbes un pouvoir inhibiteur, ce dernier se retrouverait, tout au moins partiellement, dans les extraits aqueux. C'est ce qu'il nous a été donné de vérifier par les expériences suivantes, où nous envisagerons successivement, vis-à-vis de ces extraits, le comportement de la microflore totale d'une « terre témoin », et celui d'une « culture pure » d'*Azotobacter chroococcum*.

I. — EXPÉRIENCES SUR LA FLORE TOTALE BACTÉRIENNE.

PRÉPARATION DES EXTRAITS. — Deux tourbes, prélevées en forêt de Rambouillet, que nous appellerons respectivement C et A, ainsi qu'une terre témoin TG prélevée à l'Institut Pasteur, sont traitées de la manière classique pour l'obtention des extraits de terre : poids égaux de terre et d'eau sont mélangés dans un

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 mars 1952.

ballon et laissés en contact vingt-quatre heures. Après quoi, les uns (extraits à chaud) sont portés à l'autoclave trente minutes à 120-130°, puis filtrés sur papier, les autres (extraits à froid) sont simplement filtrés. Pour les tourbes, il nous a paru intéressant de faire un essai complémentaire, en remplaçant les extraits à froid par l'eau exsudant des puits de prélèvements effectués dans les tourbières, cette eau constituant une sorte d'extrait naturel. La stérilité de tous ces extraits est obtenue par filtration sur bougie.

PRÉPARATION D'UNE DILUTION DE TERRE REPRÉSENTANT LA MICRO-FLORE TOTALE. — Nous utiliserons soit une dilution à 10^{-7} d'une terre TP, soit une dilution à 10^{-3} d'une terre TG, les deux étant prélevées à l'Institut Pasteur.

a) *Essai sur milieu solide : numération sur plaques de silico-gel.* — Les différents extraits obtenus :

TG à froid (TG f), TG à chaud (TG c),

Tourbe C à froid (C f), tourbe C à chaud (C c),

Tourbe A à froid (A f), tourbe A à chaud (A c)

sont répartis stérilement sur plaques de silico-gel, à raison de 10 cm³ par boîte ; l'imprégnation est faite en triple exemplaire pour chaque extrait. On porte à l'étuve à 50°, sous irradiation aux U. V., jusqu'à complète absorption. L'ensemencement est alors réalisé, en répartissant à l'aide d'une pipette stérile IV gouttes d'une dilution TP à 10^{-7} , que l'on étale ensuite uniformément à la surface du silico-gel imprégné. On porte à l'étuve à 28°.

Les résultats sont lus au début du troisième jour de culture. Si l'on prend la moyenne pour chaque extrait, le nombre des colonies apparues sur une plaque est le suivant :

TG f	280	TG c	580
C f	278	C c	328
A f	232	A c	400

b) *Essai en milieu liquide : détermination photométrique de l'intensité de la croissance.* — On opère avec les mêmes extraits obtenus à partir de prélèvements renouvelés (datant de huit jours), soit :

TG f et TG c ;

C c et C fn = eau d'exsudation naturelle prélevée dans la tourbière ;

A c et A fn = eau naturelle de la tourbière.

Ces extraits, filtrés à la bougie, sont répartis stérilement en tubes, à raison de 10 cm³ par tube et de 9 tubes par extrait. On ajoute dans chaque échantillon I goutte, mesurée à la pipette compte-gouttes, de solution stérile de glucose à 30 p. 100 et

I goutte d'une solution de nitrate d'ammonium de même concentration, stérilisée à l'autoclave.

L'ensemencement est effectué à l'aide de 1 cm³ d'une dilution de terre TG à 10⁻³, dans 6 tubes pour chaque série, les 3 autres étant réservés comme témoins. On place les tubes dans l'étuve à 28°, sur un agitateur mécanique continu. En rapportant chaque témoin à la division 0 du galvanomètre, les chiffres d'augmentation d'opacité mesurant la croissance des germes sont, après quarante-huit heures, en degrés photométriques :

TG f.	91,7	TGc.	267
C fn.	20	C c.	79,3
A fn.	47	A c.	81

Ces chiffres résument la moyenne faite sur 3 tubes. Le quatrième jour, malgré l'hétérogénéité de tous les milieux consécutive à la culture, les différences persistent. On obtient alors, en moyenne, des 3 tubes restants :

TG f.	409	TG c.	290
C fn.	23	C c.	107
A gn.	69	A c.	136

c) *Conclusions des deux essais effectués en milieu solide et en milieu liquide, sur la microflore totale d'un sol témoin normal.* — Il appert que les extraits aqueux de tourbe possèdent un effet inhibiteur notable sur la croissance de la totalité des bactéries présentes dans un sol normal. Cet effet est surtout remarquable dans le cas de C fn, puisqu'un témoin, réalisé avec 10 cm³ d'eau de Seine stérile + I goutte d'une solution de NO₃NH₄ stérile de même concentration, et ensemencé par le même poids de terre TG, donne lieu à une culture de 35° photométriques après quarante-huit heures, soit supérieure de 15°. On ne saurait attribuer ce pouvoir inhibiteur à une simple question de concentration des extraits en substances nutritives solubles, puisque l'addition de C et de N, dans des proportions rigoureusement identiques (sous forme de glucose et de nitrate), doit compenser les différences de concentration préexistantes. Fort improbable nous paraît être aussi l'hypothèse explicative basée sur la seule notion de pH, car les différences notées dans la mesure de ceux-ci sont peu importantes. En effet :

T f est à pH	7	T c à pH	7,1
C fn à pH.	6,7	C c à pH	6,2
A fn à pH.	6,7	A c à pH	6,3

Reste la solution consistant en l'existence de véritables « substances inhibitrices », notion que nous aimerions pouvoir préciser par la suite, grâce à des extractions fractionnées pratiquées sur des couches différentes de tourbe à l'aide de solvants différents.

II. — EXPÉRIENCE SUR UNE CULTURE PURE d'*Azotobacter chroococcum*.

Des extraits de tourbe et de terre, obtenus de manière identique, sont répartis à raison de 10 cm³ par tube et additionnés chacun de 1 cm³ d'une solution de mannite à 20 p. 100. On ensemence avec IV gouttes d'une suspension d'*Azotobacter chroococcum*, réalisée en homogénéisant bien une anse de culture pure dans 10 cm³ d'eau de Seine stérile. Après quarante-huit heures d'étuve à 28°, on note les résultats suivants, par lecture photométrique :

TG f.	78	TG c	213
C f.	6	C c	4
A f.	3	A c	8

Conclusions. — Le pouvoir inhibiteur des extraits aqueux de tourbe vis-à-vis de la croissance des *Azotobacter* n'apparaît pas douteux. Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux dérivant de l'application aux tourbes de la technique classique de numération des *Azotobacter*, technique à laquelle les tourbes donnent une réponse parfaitement négative.

III. — CONCLUSION GÉNÉRALE.

Que les tourbes constituent un « milieu microbien » très spécial, cela nous paraît évident, ne fût-ce que par les conditions physico-chimiques particulières, qui les régissent. Que, d'autre part, ces tourbes soient douées d'un réel « pouvoir inhibiteur » sur la croissance des germes banaux du sol, cela semble découler nettement des expériences précitées. Ce pouvoir se prévaut-il avant tout de facteurs physiques, de facteurs chimiques ou de facteurs biologiques ? Est-il licite de vouloir séparer ces facteurs ? Peut-on isoler des tourbes une « substance inhibitrice » ? Ce sont autant de problèmes qui restent à élucider.

POUVOIR AMMONIFIANT RÉEL ET POTENTIEL DU SOL DANS SES RAPPORTS AVEC LA MICROFLORE

par O. COPPIER et J. POCHON (*).

*(Institut Pasteur, Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du sol.)*

Le phénomène d'ammonification présente une grande importance en agrobiologie ; en effet, l'azote organique, qu'il provienne des fumiers, des tissus végétaux et animaux morts, des fixateurs d'azote atmosphérique, doit obligatoirement subir une minéralisation pour être utilisable par les végétaux. Le premier temps de cette minéralisation, l'ammonification, amène l'azote organique sous forme ammoniacale. Mais il ne s'agit là que d'un stade intermédiaire, cet azote réduit étant ultérieurement oxydé en nitrites et nitrates. Il est donc de la plus grande importance, étant volatil, que l'ammoniac ne s'échappe pas dans l'atmosphère ; or, dans certaines conditions, en particulier lors d'apport massif d'azote organique en terrain alcalin, cette perte n'est pas négligeable, puisqu'elle peut atteindre en quatre-vingts jours 40 p. 100 de l'azote introduit, que ce soit sous forme d'urée ou de poudre de sang [1].

Le pouvoir ammonifiant d'un sol donné mériterait donc d'être déterminé de façon aussi précise que possible, pour guider l'agriculteur qui désire réaliser une fumure organique et aussi pour être intégré dans une analyse pédologique complète qui permettrait ultérieurement d'établir des rapports entre la fertilité d'un sol et l'activité de ses groupements microbiens zymogènes.

La détermination de ce pouvoir est malaisée car la quantité totale d'ammoniac libérée par la flore ammonifiante, dans un sol enrichi en azote organique, est la somme de l'ammoniac qui se dégage, de l'ammoniac fixé sur la terre par voie physique et chimique, de l'ammoniac immédiatement réutilisé par les hétérotrophes pour leurs synthèses, de l'ammoniac oxydé par les autotrophes nitrificateurs. Or, on ne peut mesurer que la première de ces quantités, l'ammoniac qui se dégage dans le milieu ambiant.

L'un de nous, avec Tchan [2], avait proposé une méthode dont

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 avril 1952.

le principe est le suivant : enrichissement d'une certaine quantité de terre avec une quantité connue d'azote protéique (poudre de sang par exemple) et dosage journalier de l'ammoniac dégagé. Les résultats obtenus peuvent être exprimés par une courbe d'ammonification en fonction du temps.

Certaines modalités de la technique, et en particulier l'importance du rapport surface/volume de la terre, ont été précisées par J. Kauffmann et M. A. Chalvignac [3]. Les relations entre le dégagement d'ammoniac et la teneur du sol en humus, plus précisément avec son rapport C/N, ont été étudiées (Pochon et Tchan [4] ; Chalaust [5] ; c'est ainsi que dans les sables très peu humifiés le dégagement est beaucoup plus important que dans les sables très humifiés, en raison d'une plus faible réutilisation et fixation physique et chimique.

L'interprétation des courbes d'ammonification est toujours délicate en raison des multiples facteurs qui interviennent, facteurs qui impliquent également l'irrégularité des courbes.

Ceci nous a conduits à préciser et même à modifier les modalités techniques, pour étudier séparément l'influence de chacun des facteurs, en particulier éliminer la fixation de l'ammoniac sur le substrat par voie physique et chimique (échange d'ions).

Cherchant un milieu minéral dont la consistance physique se rapproche de celle de la terre sans en avoir les inconvénients (hétérogénéité physique, chimique, biologique), nous avons eu l'idée d'utiliser du sable quartzueux stérile, additionné de poudre de sang etensemencé avec une dilution de la terre à étudier.

TECHNIQUE.

1° MILIEU. — 50 g de sable de Fontainebleau sont additionnés de 5 p. 1 000 de poudre de sang desséché, soit 0,25 g ; le tout est stérilisé à l'autoclave dans une boîte de Petri de 10 cm de diamètre. Puis on amène à 25 p. 100 d'humidité (soit 12 cm³) avec la solution saline standard de Winogradsky diluée au 1/20, stérile.

2° ENSEMENCEMENT. — Onensemence alors avec 1 cm³ d'une dilution au 1/10 de la terre à étudier (cette dilution étant obtenue en broyant au mortier 1 g de terre, rapporté au poids sec, dans 9 g d'eau de Seine stérile). On a soin de répartir uniformément l'ensemencement en mélangeant, puis en égalisant la surface avec une spatule.

3° DOSAGES JOURNALIERS. — La boîte ainsi préparée etensemencée est placée, sans couvercle, dans une grande boîte de Petri de 15 cm de diamètre contenant de l'acide sulfurique

titré (N/50) et quelques gouttes d'une solution alcoolique de rouge de méthyle comme indicateur. La grande boîte est fermée avec son couvercle et placée à l'étuve à 28°. Toutes les expériences sont faites en triple. Chaque jour on détermine l' NH_3 dégagé en dosant par différence la quantité d'acide restante. Les titrages sont poursuivis pendant quatorze jours.

4° Nous avons trouvé intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus par la technique classique en terre dont nous rappelons le détail.

50 g de la terre à étudier, exprimés en poids sec, sont additionnés de 10 p. 1 000 de sang desséché (soit 0,5 g) et amenés à 25 p. 100 d'humidité avec la quantité calculée d'eau de Seine stérile. C'est sur cette terre vivante, contenant sa microflore totale, qu'on suit la courbe d'ammonification avec les mêmes modalités techniques que précédemment (voir 3°).

RÉSULTATS.

L'examen comparé des courbes obtenues avec les deux techniques montre que, si l'on opère en sable, les irrégularités des résultats sont moindres, les graphiques plus réguliers ; de plus, et surtout, d'un examen d'ensemble de tous nos essais comparatifs terre-sable, il se dégage que, sur sable, les résultats sont plus fidèles et plus concordants. Ceci est vraisemblablement en rapport avec le moins grand nombre de facteurs en jeu, comme nous l'avons dit plus haut. La quantité totale de NH_3 dégagé est plus grande même avec une quantité de sang moindre qu'en terre (fig. III). En effet, la fixation de NH_3 est très faible, sur le substrat sable et la réutilisation minime.

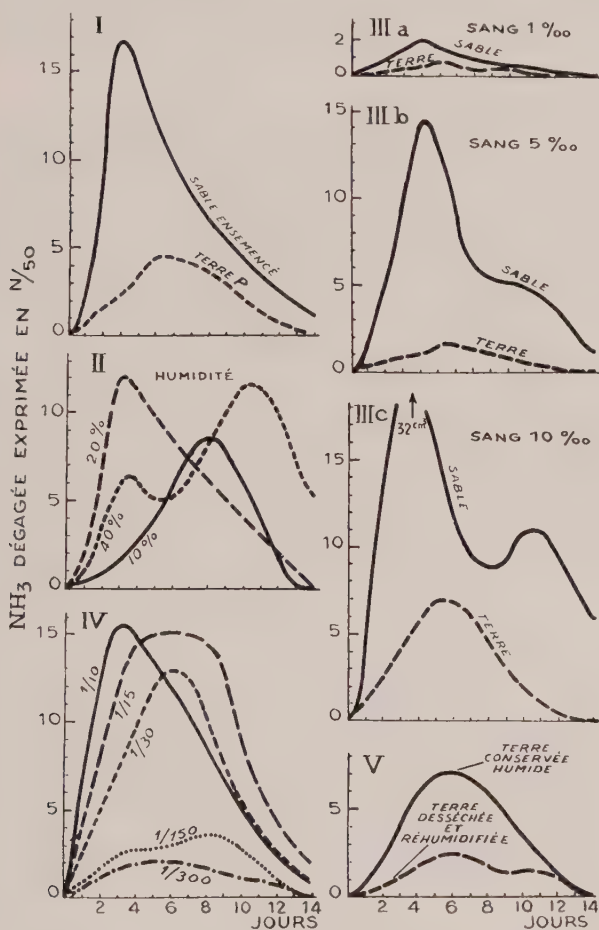
Enfin, le maximum de dégagement (clocher de la courbe) est plus précoce, en moyenne le troisième jour au lieu du sixième sur la terre (Cf. fig. I).

Afin de rechercher les conditions écologiques optima de l'ammonification (qui doivent nous permettre de mieux comprendre son rôle en agrobiologie et ses rapports avec la fertilité d'un sol), nous avons voulu analyser les différents facteurs expérimentaux (humidité, quantité de l'apport azoté, quantité de terre servant à l'ensemencement, conservation de la terre au laboratoire) et étudier leur influence.

INFLUENCE DES DIVERS FACTEURS EXPÉRIMENTAUX.

1° TAUX D'HUMIDITÉ DU SUBSTRAT. — Plusieurs séries d'essais ont été poursuivies avec 10 p. 100, 20 p. 100, 40 p. 100 d'humidité. Les courbes (fig. II) diffèrent surtout par leurs formes ; les

résultats les plus fidèles sont obtenus avec 20 p. 100, ce qui correspond d'ailleurs à l'humidité moyenne des terres à l'étude. Les résultats obtenus avec 10 p. 100 et 40 p. 100 se traduisaient par des courbes irrégulières, et peu fidèles d'une boîte à l'autre.



Nous avons néanmoins constaté que, d'une manière générale, le démarrage de la réaction était beaucoup plus tardif lorsqu'on s'éloignait, en plus ou en moins, du taux moyen de 20 à 25 p. 100.

2° TENEUR EN AZOTE PROTÉIQUE. — Nos essais antérieurs (*loc. cit.* 2) avaient été réalisés avec la poudre de sang, urée, la farine de soja et la poudre de trèfle ; ils nous avaient montré que plus

la substance était complexe et la teneur relative en carbone élevée, plus le dégagement de NH_3 était faible et tardif. Les résultats les plus facilement interprétables étaient obtenus avec la poudre de sang et l'urée. Dans la série d'expériences actuelle nous n'avons utilisé que la poudre de sang, l'urée étant attaquée par une flore beaucoup plus spécifique et de signification moins générale.

Nous avons opéré, en sable et en terre, avec 1, 5 ou 10 g p. 1 000.

Sur *sable* le dégagement est déjà appréciable avec 1 p. 1 000 (fig. III a) ; avec 10 p. 1 000 de dégagement est si abondant que les dosages deviennent malaisés (fig. III c). La teneur de 5 p. 1 000 nous a paru la plus favorable (fig. III b).

Sur *terre* on note, avec 1 p. 1 000 un dégagement trop faible pour être retenu comme résultat quantitatif. Le dégagement d' NH_3 est encore très faible avec 5 p. 1 000. La teneur optima pour la régularité et la fidélité des lectures est de 10 p. 1 000 (fig. III).

3° QUANTITÉ DE TERRE SERVANT A ENSEMENTER. — Ce facteur ne peut évidemment être étudié que sur sable puisque, avec la technique sur terre, celle-ci n'est pas ensemencée et que c'est sa propre microflore qui agit.

Cependant, pour avoir un point de comparaison, nous avons également préparé des plaques de terre stérilisée par la chaleur additionnée de poudre de sang comme dans la technique classique, et ensemencée avec des dilutions variables de terre.

Dans les deux cas les ensemencements ont été réalisés avec 1 cm^3 de dilution de terre au 1/300, 1/150, 1/30, 1/15, 1/10. Le dégagement de NH_3 est plus faible avec 1/300 et 1/150 (mais les résultats ne sont pas toujours aussi nets qu'avec la terre qui a servi pour notre expérience de la fig. IV) ; il est comparable avec les autres dilutions. Il est vraisemblable que la prolifération des germes d'ensemencement se fait, comme dans un milieu liquide, en fonction des substances nutritives présentes, quel que soit le nombre de germes ensemencés, au delà d'un certain taux. Aussi, par commodité technique seulement, avons-nous choisi la dose de 1 cm^3 d'une dilution au 1/10.

4° CONSERVATION DE LA TERRE. — Nous avons voulu voir également si le fait de dessécher la terre pour sa conservation, puis sa réhumidification pour l'expérience, a une influence sur les résultats. (Cela serait d'une grande commodité technique).

Dans ce but, une expérience a été réalisée comparativement sur une terre fraîche et sur la même terre desséchée à la température du laboratoire, sous vide et en présence de CaCl_2 , puis ramenée soit à 25 p. 100 d'humidité, soit à son degré d'humidité au moment de son prélèvement.

En ramenant à l'humidité initiale, le dégagement d' NH_3 est minime ; en ramenant à 25 p. 100 d'humidité, le dégagement est plus important, mais encore inférieur à celui de la terre non traitée (fig. V).

On constate que la dessiccation modifie les résultats puisque la quantité de NH_3 dégagée est plus faible. Il ne semble donc pas que cette technique soit satisfaisante.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Les expériences et les résultats qui viennent d'être rapportés permettent d'entrevoir différents points de vue dans l'étude et la mesure du phénomène d'ammonification, et de définir un *pouvoir ammonifiant réel* (celui de la terre dans ses conditions écologiques normales) et un *pouvoir ammonifiant potentiel* (celui de la même terre placée dans les conditions écologiques optima, que nous ne pourrions délimiter que lorsqu'auront été fixées les influences exactes de tous les facteurs inconnus intervenant dans le phénomène).

Si l'intérêt se porte sur le pouvoir ammonifiant d'un sol donné, à un moment donné, dans des conditions écologiques données, il est certain que la technique valable est celle sur terre fraîche additionnée de 10 p. 1 000 de poudre de sang, et maintenue au même taux d'humidité qu'au moment du prélèvement. C'est ce que nous appelons le *pouvoir ammonifiant réel*. Il est évidemment variable selon les saisons, en fonction de la pluviosité, etc. Trois facteurs essentiels interviennent : la microflore, la constitution physique (granulométrie) et chimique de la terre, les conditions écologiques (tassement, humidité, aération...).

Si l'intérêt se porte sur le pouvoir ammonifiant dans les conditions optima, c'est encore à la technique sur terre que l'on s'adressera, modifiée en conséquence. Les résultats obtenus donneront le *pouvoir ammonifiant potentiel* d'une terre.

Maïs pour l'étude des facteurs agissant sur le phénomène de l'ammonification, il faut considérer l'activité de la microflore indépendamment de la terre qui l'héberge. Dans ce cas, la technique sur sable est la seule à utiliser et les résultats correspondent au *pouvoir ammonifiant de la microflore*.

C'est, pour l'étude du groupement physiologique ammonifiant, la méthode la plus aisée, la plus régulière, la plus spécifique, puisque nous éliminons la plupart des facteurs inconnus. Son grand intérêt réside surtout dans la possibilité d'opérer en milieu synthétique connu dont on peut faire varier à volonté les conditions : température, humidité, pH, addition d'ions et de substances diverses, sucre, alcools, parasitocides et fongicides utilisées en agriculture, composés azotés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. P. MARTIN et H. D. CHAPMAN. *Soil Sci.*, 1951, **71**, 25-34.
- [2] J. POCHON, Y. T. TCHAN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 696.
- [3] J. KAUFFMANN et M.-A. CHALVIGNAC. *Ces Annales*, 1950, **79**, 228.
- [4] J. POCHON, Y. T. TCHAN, M.-A. CHALVIGNAC et R. CHALAUST. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1118.
- [5] R. CHALAUST. *Ces Annales*, 1948, **74**, 62.

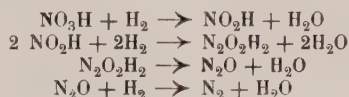
LA PUISSANCE DÉNITRIFIANTE DU SOL

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ÉVALUATION (*)

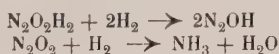
par H. DE BARJAC.

(Institut Pasteur. Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du sol.)

La réduction des nitrates est l'apanage de nombreux microbes du sol. Ce phénomène a surtout, jusqu'ici, fait l'objet d'études aboutissant à une classification de ces microbes, isolés du sol et en culture pure, en fonction des produits de réduction (NO_2 , NH_3 , N_2 , N_2O), et de leur utilisation métabolique. Ainsi en est-il des relations données par Waksman [1] et Verona [2]. Le schéma qui s'en dégage est le suivant :



L'acide hyponitreux peut également être réduit comme suit :



La puissance de la microflore dénitrifiante, envisagée au sein même d'un sol déterminé, reste imprécise et confuse, quant à son mode d'évaluation. Nous avons donc cherché à préciser ce mode. Nous proposons ici moins une technique de mesure de la « dénitrification effective » se produisant dans une terre, qu'une appréciation qualitative et quantitative de la « puissance dénitrifiante » de la microflore, puissance dont les conditions écologiques déterminent, dans le sol, l'efficacité. La méthode utilisée dans ce but se présente comme suit :

PRINCIPE.

Ensemencement d'un milieu liquide salin avec des dilutions croissantes de terre et recherche systématique des zones correspondant aux trois phases du phénomène étudié, à savoir :

- Présence de nitrates,
- Présence de nitrites,
- Présence d'ammoniaque.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 avril 1952.

En effet, ces 3 corps nous ont paru les plus adéquats pour cerner une étude pratique de la dénitrification, la mesure du dégagement d'azote moléculaire ne pouvant, pour des raisons techniques, faire maintenant l'objet d'une méthode standard.

MODE OPÉRATOIRE.

1° PRÉPARATION DU MILIEU. — Une solution contenant :

NO ₃ K	2 g
Glucose	10 g
CO ₃ Ca	5 g
Milieu salin de Winogradsky à 1/20	Q. S. p. 1 000 cm ³

est répartie, à raison de 1 cm³, en tubes à hémolyse. On stérilise à 110°, vingt minutes.

2° PRÉPARATION DES DILUTIONS. — A partir d'une dilution au 1/10, effectuée au mortier stérile, avec 1 g de terre homogénéisée dans 9 g d'eau de Seine stérile, on réalise une gamme de dilutions allant de 10⁻¹ à 10⁻⁸.

3° ENSEMENCEMENT. — Chaque dilution est répartie en 6 tubes de milieu à raison de 0,5 cm³. On agite et l'on porte à l'étuve à 28°.

4° LECTURES. — Les deuxième, quatrième, sixième, huitième, onzième et quatorzième jours, soit 6 lectures, une gamme de dilutions est testée :

A la diphénylamine sulfurique, après élimination de NO²⁻ par l'urée → NO³⁻,

Au réactif de Griesz → NO²⁻,

A l'iodure du potassium (10 p. 100) et l'extrait de Javel (le réactif de Nessler étant, en effet, inutilisable du fait de la présence de glucose, nous y substituons la recherche d'une formation d'iodure d'azote) → NH³.

Ainsi, l'on peut suivre simultanément l'évolution respective des nitrates, des nitrites et de l'ammoniaque.

RÉSULTATS OBTENUS.

Nos essais ont porté sur quatre terres choisies volontairement très diverses :

T G, prélevée dans les jardins de l'Institut Pasteur ;

C 1, prélevée dans les végétaux de surface en voie de transformation, dans une tourbière, en forêt de Rambouillet ;

C 4, prélevée en profondeur de la même tourbière ;

T F, prélevée dans le parc de Saint-Cloud.

Les réponses données par ces terres sont exprimées dans les tableaux suivants.

Une représentation graphique permet de se faire une idée plus nette des phénomènes (voir graphiques et tableaux ci-joints).

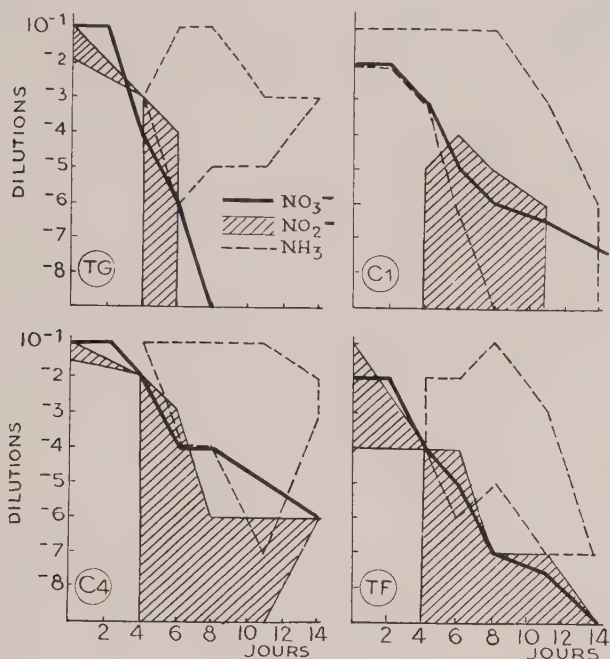


TABLEAU I. — Recherche de l'Ammoniaque.

	TG	C ₁	C ₄	TF
Dilutions				
10 ⁻⁸	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -7	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -6	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -5	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -4	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -3	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -2	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
" -1	- - - - -	- - - + +	- - - - -	- - - - -
jours	2 4 6 8 11 14	2 4 6 8 11 14	2 4 6 8 11 14	2 4 6 8 11 14

TABLEAU II. — Recherche des Nitrates.

Dilutions	IO -8	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-				
	" -7	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-			
	" -6	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-			
	" -5	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-			
	" -4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ξ	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-			
	" -3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-			
	" -2	ξ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-			
" -1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-				
jours:		2	4	6	8	11	14		2	4	6	8	11	14		2	4	6	8	11	14		2	4	6	8	11	14		2	4	6	8	11	14

TABLEAU III. Recherche des Nitrates.

		TG					C ₁					C ₄					TF								
Dilutions	IO -8	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-				
	" -7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
	" -6	+	+	+	-	-	+	+	+	+	ξ	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
	" -5	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
	" -4	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	ξ	-	-	+	+	-				
	" -3	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-				
	" -2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-				
" -1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-					
jours:		2°	4	6	8	11	14	2	4	6	8	11	14	2	4	6	8	11	14	2	4	6	8	11	14

DISCUSSION.

Comme on pouvait s'y attendre, l'aperçu donné par ces essais sur la « puissance dénitrifiante » des quatre terres envisagées révèle de nettes divergences entre ces terres.

L'attaque des nitrates est beaucoup plus rapide dans T G, puisque ces derniers ont totalement disparu le huitième jour, alors que l'on peut encore les mettre en évidence le onzième jour dans T F, et surtout dans C 1 et C 4. Leur disparition coïncide

pour T F avec le quatorzième jour, alors qu'il en reste dans C 1 et C 4.

L'apparition des nitrites est fugace, spécialement dans T G où elle dure du deuxième au sixième jour inclus. Il est intéressant de noter que, pour cette terre, la disparition des nitrates coïncide avec celle des nitrites. La formation des nitrites, plus tardive dans C 1, est aussi plus prolongée, comme dans C 4 et T F. Là encore apparaît la relation avec les nitrates, puisque leur présence au quatorzième jour dans C 1 et C 4 concorde avec celle de traces de nitrites, et leur absence dans T F avec celle de ces mêmes nitrites. A partir du sixième jour, la réaction présente généralement des irrégularités. Nous exprimons les résultats par une moyenne.

L'apparition de l'ammoniaque suit celle des nitrites, sauf dans C 1 dont la texture, essentiellement faite de sphaignes, induit à admettre la superposition d'un phénomène d'ammonification. T G donne lieu à une production d'ammoniaque qui, décalée par rapport à celle des nitrites, se poursuit jusqu'au onzième jour inclus, en suivant un ordre bien déterminé de dilution ; ainsi est délimitée une zone se fermant le quatorzième jour.

Ceci traduit une réutilisation de l'ammoniaque comparable à celle qui se produit à la fin du processus d'ammonification. La formation d'ammoniaque apparaît à la fois plus intense et plus tardive dans C 4 et T F.

Le même schéma général, qui paraît ainsi conduire la réduction des nitrates à travers les trois stades étudiés, comporte donc, ainsi qu'en témoignent les graphiques, de nettes différences suivant les terres, quant à la vitesse d'apparition, la durée, l'extension et le chevauchement des phénomènes. On peut rapprocher ces résultats de ceux obtenus, avec une toute autre méthode, sur le contenu de panse du mouton par Lewis [3] qui démontre la formation de NH^3 et de $\text{NO}^2 -$, ainsi que la fugacité de ces nitrites.

CONCLUSIONS.

Au point de vue qualitatif, les divers sols étudiés nous conduisent à considérer la dénitrification comme un phénomène complexe où s'enchaînent et s'interpénètrent, au cours d'expérience, les phases de disparition des nitrates, d'apparition et de disparition des nitrites et de l'ammoniaque. Au point de vue quantitatif, ces phases se déroulent dans des limites bien définies de concentration en terre, donc de concentration en germes dénitrificateurs. Ces limites circonscrivent graphiquement de véritables « zones de réaction » nettement différentes selon les terres.

Le pouvoir dénitrifiant d'une terre jusqu'ici considéré en quelque sorte comme pathologique, sous l'aspect négatif d'une perte

d'azote moléculaire, nous paraît aussi comporter un aspect positif. Il rentre, en effet, dans l'activité totale de la microflore d'un sol, puisqu'il traduit le pouvoir de transformation de cette flore vis-à-vis des nitrates, dont on sait l'importance dans la constitution des tissus végétaux d'une part, et dans celle du sol même, d'autre part.

Une technique simplifiée pourrait être appliquée à l'évaluation de la puissance dénitrifiante, en réalisant une gamme de dilutions et en recherchant sur celle-ci, après quatre jours d'incubation à l'étuve à 28°, le dernier tube où l'on est en présence de nitrates. C'est le test le plus pratique et le plus fidèle, comme nous pouvons en conclure, d'après les expériences réalisées jusqu'ici. Mais ces dernières ne nous permettent pas de nous prononcer sur toutes les déductions à tirer de cette puissance dénitrifiante ainsi évaluée. En quelle mesure la vitesse de disparition des nitrates traduit-elle leur assimilation ou, au contraire, leur perte pour le sol et par conséquent pour les végétaux qui y sont cultivés ? Y a-t-il « couplage » entre ces deux chaînons du cycle de l'azote : nitrification et dénitrification ?

En attendant de pouvoir répondre à ces questions, il n'en reste pas moins établi un comportement différentiel des terres vis-à-vis de la dénitrification, envisagée suivant la méthode exposée, donc un nouveau caractère distinctif à introduire dans l'analyse pédologique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. WAKSMAN. Principles of Soil Microbiology (Williams et Wilkins, ed., 1927).
- [2] O. VERONA. Elementi di microbiologia pedologica. Macri, ed., 1947.
- [3] LEWIS. *Bioch. J.*, 1951, **49**, 149.

SURRÉNALES ET INFECTION (1)

par L. CHEDID, F. BOYER et M. SAVIARD.

*(Collège de France, Laboratoire d'Endocrinologie.
Institut Pasteur,
Service de Chimie Thérapeutique B.)*

On connaît le succès thérapeutique de la cortisone (2) vis-à-vis du rhumatisme. En contre-partie de cette réussite, sont venues s'inscrire des complications infectieuses graves. L'expérimentation a souligné l'aspect défavorable de ce traitement, d'une manière qui nous paraît exagérée. Nous avons eu, en effet, l'occasion de signaler l'action curative de la cortisone vis-à-vis d'une infection expérimentale [1]. Néanmoins, nous avons constaté aussi que l'on peut assister à une inversion des effets en modifiant les conditions de l'expérience [2].

Dans le présent travail, nous apportons des faits nouveaux qui expliquent en partie le mécanisme de cette action paradoxale, ainsi que les divergences qui en découlent.

Mais avant de les exposer, il nous faut passer en revue l'état actuel de cette question et rappeler sommairement quelques données concernant la surrénale et ses produits de sécrétion. Cette glande à sécrétion interne, logée au-dessus de chaque rein, se compose de deux parties : au centre, la médullaire qui sécrète l'adrénaline et, tout autour, le cortex, disposé en trois couches de cellules différentes.

Le cortex sécrète un très grand nombre d'hormones, dont le pouvoir physiologique est parfois ignoré [3]. Des 29 stéroïdes qui ont été isolés de la cortico-surrénale, 5, dont la progestérone, étaient déjà connus par leur activité hormonale différente. Des 24 autres, 6 seulement possèdent une activité « corticale ». On n'a aucune preuve que ceux-ci soient sécrétés par la glande, car on a isolé du sang veineux seulement la corticostérone et la

(1) Nous remercions M. le professeur J. Tréfouël, dont l'aide nous a permis de réaliser ce travail.

Ceux qui ont assisté aux leçons faites par M. le professeur R. Courrier au Collège de France, sur les « Rapports entre hormones et infection », reconnaîtront tout ce que ce mémoire lui doit.

(2) Nous avons utilisé, dans nos expériences, la « cortone » (Merck), gracieusement fournie par l'Institut national d'Hygiène.

17-oxycorticostérone. Les produits de sécrétion de la cortico-surrénale peuvent néanmoins se grouper dans les trois ordres suivants :

1° Des hormones sexuelles ;

2° Des minéralo-corticoïdes, chargés de la régulation des électrolytes et dont l'acétate de désoxycorticostérone (DOCA), hormone de synthèse, est très représentatif ;

3° Des gluco-corticoïdes, parmi lesquels se trouve la cortisone ou composé E, dont nous parlerons en détail plus loin, ainsi que la déhydrocorticostérone ou composé A.

Le rôle capital du cortex surrénalien est bien connu : son ablation entraîne la mort. Son activité sécrétoire dépend de l'hypophyse antérieure qui le stimule au moyen de l'hormone corticotrope (ACTH). Cette régulation surrénale-hypophyse entraîne ce que R. Courrier a appelé un équilibre glandulo-hormonal (atrophies et hypertrophies compensatrices de Selye), notion sur laquelle il est utile d'insister, car nous aurons à l'appliquer plus loin.

L'ablation de toute glande endocrine provoque la disparition de son hormone du sang circulant, disparition à laquelle l'hypophyse répond par une décharge exagérée de stimulines correspondantes (3). Par contre, tout apport exogène d'hormone administré pendant un certain temps met l'hypophyse au repos et entraîne à la longue, par ce mécanisme, l'atrophie de la glande homologue.



Quel est le rôle de la surrénale dans l'infection ?

L'absence de cette glande affecte fâcheusement l'organisme, car toute agression retentit sur elle.

Selye a démontré [4] que tout « stress » (agression non spécifique de l'organisme : froid, toxine, traumatisme) provoquait, par l'intermédiaire d'une décharge pituitaire, une hypertrophie et un fonctionnement intensifié des surrénales, mettant en jeu, par ce moyen, une série de mécanismes défensifs. C'est ce « syndrome d'alarme et d'adaptation » qui permet à l'organisme de se défendre, bien que parfois cette réaction soit tellement exagérée qu'elle devienne à son tour responsable de certaines maladies.

(Nous aurons l'occasion, plus loin, d'évoquer cette théorie à propos de la réponse surrénalienne que fait la Souris à une Salmonellose expérimentale.)

(3) Evans et ses collaborateurs ont récemment mesuré, chez le Rat, cette augmentation d'ACTH dans le sang ainsi que le taux de sécrétion de l'hypophyse après ablation du cortex [5].

Certains travaux de Tonutti présentent de grandes analogies avec ce syndrome et mettent en évidence le rôle que joue le couple hypophyse-surrénale dans l'inflammation. On sait que l'injection à un cobaye de toxine diphtérique détermine une hypertrophie hémorragique de ses surrénales, ainsi qu'un œdème au point d'inoculation. D'autre part, un animal ébouillanté présente les mêmes modifications au niveau du cortex, plus une série de lésions au niveau de la peau vingt-quatre heures plus tard (chute des poils, œdème, ulcération).

En hypophysectomisant des animaux avant de les ébouillanter ou de leur injecter la toxine, Tonutti constate que les lésions surrénales et cutanées n'apparaissent plus. Aussi est-il permis de penser, avec l'auteur, que ces « stress » ont retenti sur l'hypophyse qui réagit en stimulant le cortex, lequel est responsable des lésions qui sont en réalité des processus de défense inflammatoire [6, 7]. Tonutti a démontré depuis que les lésions du cortex ne sont pas la conséquence d'une hypersécrétion pituitaire. Néanmoins, pour qu'elles se produisent, la présence d'ACTH est indispensable [8].

Grâce à la surrénalectomie, le rôle prépondérant que joue cette glande dans la résistance est établi très nettement.

L'histoire de chaque découverte endocrinologique commence invariablement par l'étape suivante : l'ablation de la glande et les conséquences qui en découlent. Bien que la surrénalectomie entraîne toujours la mort, cette opération est réalisable chez les petits rongeurs. Ceux-ci possèdent des surrénales accessoires, et il suffit de leur fournir de l'eau salée à 9 p. 1 000 et de les maintenir à l'abri du froid, pour les conserver vivants longtemps.

De nombreux auteurs, utilisant cette technique très facile chez le Rat et la Souris, ont constaté que la résistance de ces animaux aux toxiques les plus divers était considérablement abaissée.

Le rat opéré devient dix fois plus sensible à l'histamine. Chez cet animal, Lewis a démontré que la résistance était diminuée vis-à-vis de nombreuses substances : venin de serpent, vératrine, papavérine, digitoxine, adrénaline, et que dans le cas de la morphine, elle était même abaissée de quatre cents fois. Les animaux surrénalectomisés sont également beaucoup plus sensibles à l'infection [9].

Ceci a été mis expérimentalement en évidence dans la Trypanosomiase [10], la Bartonellose [11], la Poliomyélite [12] et la Tuberculose [13].

Le Rat blanc est très peu sensible à la tuberculose humaine ou bovine, il ne peut être infecté qu'avec du bacille aviaire. Cependant, après surrénalectomie, Steinbach a pu reproduire des lésions des viscères de l'abdomen en injectant du B. K. bovin. D'après le même auteur et dans les mêmes conditions, une

souche aviaire se montre deux fois plus virulente pour les rats surrénalectomisés que pour les témoins.

C'est parce que l'animal privé de ses surrénales résiste moins bien à l'intoxication provoquée par le germe que la mortalité est plus élevée. Perla et Marmorston l'ont démontré avec *Trypanosoma lewisi* chez le Rat. Le Rat normal infecté avec le parasite ne meurt que rarement ; le germe se multiplie d'heure en heure dans son sang, puis disparaît après avoir atteint un nombre très élevé. Par contre, s'ils sont surrénalectomisés, 70 p. 100 des animaux meurent, sans toutefois que la multiplication des trypanosomes dans le sang soit modifiée. Les auteurs attribuent la mort à l'effet toxique de ce flagellé [9].

Nous sommes arrivés aux mêmes conclusions en infectant des rats avec *Salmonella enteritidis* (variété Danysz). Dans cette expérience, nous avons administré, par voie buccale, une dose qui détermine chez cet animal une maladie intestinale mais qui ne le tue qu'exceptionnellement.

Il en est tout autrement chez le surrénalectomisé, comme le montre le tableau suivant :

	MORTALITÉ en 15 jours p. 100
I. Témoins normaux infectés	16
II. Surrénalectomisés infectés.	72
III. Surrénalectomisés témoins non infectés.	25

Cependant, les rats opérés qui succombent ne présentent qu'exceptionnellement des hémocultures positives. Si l'on sacrifie, aux mêmes moments, des témoins infectés non surrénalectomisés, le pourcentage de cas où le germe est trouvé dans le sang du cœur est le même pour les deux groupes (I et II). La mort n'est pas due, par conséquent, à un envahissement plus grand de l'organisme par le germe, mais au fait que l'animal surrénalectomisé semble résister moins bien à sa toxine. (Nous verrons plus loin que la Souris surrénalectomisée succombe au 1/100 de la dose d'endotoxine mortelle pour les souris normales.)

La dépression de la résistance n'atteindrait pas l'immunité acquise. — Ainsi des animaux vaccinés par des infections précédentes (*Trypanosoma lewisi* ou *Bartonella muris*) et qui sont ultérieurement surrénalectomisés résistent aussi bien que les témoins à une nouvelle infection [9].

Cette dissociation entre immunité naturelle et immunité acquise a été mise en évidence par Jungeblut et Steinbach en inoculant au Singe le virus de la poliomyélite. En dehors de toute infection antérieure, le sérum de cet animal, lorsqu'il atteint l'âge adulte, devient capable d'inactiver *in vitro* le virus de la poliomyélite.

Ces substances poliocides du sérum — qui n'existent pas chez le jeune singe — disparaissent après surrénalectomie.

Au contraire, l'ablation du cortex n'affecte pas les anticorps qui se sont formés à la suite d'une attaque antérieure de poliomyélite : le sérum d'un animal guéri et surrénalectomisé neutralise toujours le virus *in vitro*.

De sorte que cette même opération fait disparaître les « substances poliocides » du sang du singe adulte, mais demeure sans action sur le taux de ses anticorps.

Tout ceci fait penser « que la résistance acquise et la résistance naturelle dépendent de processus physiologiques différents et ne sont pas seulement des variations quantitatives du même processus, comme cela est généralement supposé » (Perla et Marmorston).

L'abaissement de la résistance qu'engendre la surrénalectomie peut être compensé par l'injection de différentes hormones ou extraits corticaux ainsi que par la greffe de cet organe. De nombreuses expériences, dont nous ne relèverons que quelques-unes, le démontrent.

Différents auteurs ont montré que la cortine (extrait total du cortex) compense l'accroissement de la sensibilité du Rat surrénalectomisé à l'action toxique du vaccin antityphoïdique.

Plus récemment, Lewis et Page [14, 15] l'ont montré au moyen des composés A et E. D'autre part, Delaunay et Lebrun [16, 17], utilisant l'endotoxine de *Salmonella typhi* chez la Souris surrénalectomisée, trouvent, avec ces mêmes produits, les mêmes résultats.

De notre côté, nous avons cherché à déterminer les conséquences de la surrénalectomie chez la Souris vis-à-vis des toxines de *Salmonella typhi* et de *Salmonella enteritidis* (variété Danysz).

Cette opération rend l'animal environ cent fois plus sensible. Dans ces conditions, le 1/10 de la dose mortelle pour les témoins normaux tue la Souris très rapidement (parfois en trois à six heures). Pour compenser cette déficience, il suffit d'injecter la cortisone une heure avant la toxine aux doses indiquées dans l'expérience suivante (23 novembre 1951).

Témoins souris normales	5	survies	sur 5 souris.
Témoins surrénalectomisées	0	—	—
Surrénalectomisées traitées (cortisone 500 µg).	4	—	—
Surrénalectomisées traitées (cortisone 100 µg).	3	—	—
Surrénalectomisées traitées (cortisone 10 µg).	1	—	—

L'intervention de la surrénale pour protéger l'organisme semble bien établie par les faits suivants :

1° Stimulation, par relais hypophysaire, du cortex pour s'opposer à toute agression.

2° Dépression consécutive à la surrénalectomie.

3° Dépression compensée par les extraits corticaux.

Dans ces conditions, il était permis d'espérer que des hormones corticales augmenteraient la résistance des sujets intacts, c'est-à-dire ayant des surrénales normales. Divers essais cliniques furent même entrepris dans cette voie, notamment des associations avec l'acide ascorbique au cours de la typhoïde.

On doit reconnaître, cependant, qu'expérimentalement on n'a pu mettre aucune action en évidence dans ces conditions. Pas plus l'adrénaline que la désoxycorticostérone ou les extraits totaux ne modifient la résistance des animaux normaux vis-à-vis de l'infection.

Signalons cependant quelques exceptions. Zwemer et Jungeblut [18] notent que l'extrait cortical neutralise la toxine diphtérique aussi bien *in vitro* que *in vivo* chez le cobaye. La DOCA est dépourvue de cette action. De même, Clark et Barnes [19], étudiant la toxicité de la colchicine, Ingle [20], le choc peptonique chez le Rat, arrivent aux mêmes conclusions : la cortine protège mais pas la DOCA. Nous étudierons plus loin l'action antitoxique de la cortisone signalée par Beck [21]. Néanmoins, ces rares exceptions ne modifient pas la conclusion qui découle de nombreuses expériences négatives.

Bien que solidement établi, le rôle de la surrénale semblait ne pouvoir être démontré que négativement : peut-être n'était-on pas en possession de l'hormone efficace ?

Tel était l'aspect du problème au moment de l'apparition de la cortisone qui est venue remanier la thérapeutique hormonale.

★ ★

La 17-hydroxy-11-déhydrocorticostérone ou composé E de Kendall fut isolée par ce dernier aux U. S. A., en même temps que par Reichstein en Suisse. Mais ce fut le mérite du Dr Hench, de la Mayo Clinic, de l'essayer chez un malade atteint de rhumatisme avec le succès que l'on sait. Depuis 1946, elle est obtenue par synthèse partielle à partir de l'acide désoxycholique [22]. Récemment, sa préparation a été abrégée considérablement par un procédé d'extraction végétale [23].

Quelles sont les propriétés physiologiques de la cortisone, par quel mécanisme influence-t-elle les arthrites ? Telles sont les questions que nous allons esquisser avant d'exposer les résultats récents concernant l'action de cette hormone et de l'ACTH employés au cours d'infections expérimentales.

Des diverses actions physiologiques de cette hormone, dont on trouvera une revue détaillée dans l'article d'Ingle [24], retenons les principales :

1° Néoglycogénèse. Augmentation des acides aminés dans le sang et transformation au niveau du foie, ce qui provoque une augmentation du glycogène hépatique (cette action sert de test). Elle diminue l'utilisation des glucides par les tissus (action opposée à celle de l'insuline).

2° Action sur la formule sanguine. Baisse des éosinophiles et des lymphocytes (allant de pair avec une involution du tissu lymphoïde) et modification du taux de globulines et des albumines. La surrénale exerce un rôle prépondérant sur la constitution de la formule sanguine. Cependant, certaines substances pyrogènes et le vaccin anti-typhoïdique provoquent les mêmes modifications leucocytaires, même en l'absence de cette glande, ce qui fait penser qu'il existe des mécanismes de suppléance [25, 26].

3° Action sur le tissu conjonctif : retard de la cicatrisation.

En dehors de ces trois propriétés fondamentales, la cortisone a de nombreuses répercussions physiologiques et même psychologiques [27], lesquelles se manifestent parfois fâcheusement au cours du traitement. Aussi s'est-on demandé si son action anti-rhumatismale était physiologique ou pharmacologique. Nombre d'auteurs pensent, en effet, que les doses utilisées sont tellement élevées qu'elles n'ont rien à voir avec un processus hormonal habituel.

Kendall a récemment traité ce problème. Les raisons qu'il avance pour démontrer que la cortisone est utilisée de manière physiologique nous paraissent très valables [28].

Toujours est-il que c'est sans doute par son action sur le tissu conjonctif que cette hormone soulage les arthrites. Mais cette action anti-inflammatoire ne favoriserait-elle pas l'infection ?

Dès le premier succès thérapeutique, la cortisone, ainsi que l'ACTH furent administrées dans les affections les plus diverses, amenant souvent une rémission instantanée de tous les signes généraux et une disparition rapide de certaines lésions, encourageant des essais de plus en plus nombreux. C'est alors que l'on vit se produire certains accidents graves.

Par exemple, au cours du traitement à l'ACTH d'un iritis, éclate une méningite tuberculeuse mortelle (Mach [29]) ; un rhumatisant traité fait une poussée de tuberculose pulmonaire foudroyante (Fred et ses collaborateurs [30]). En règle générale, chez les tuberculeux traités par la streptomycine et la cortisone, les signes cliniques disparaissent [31], mais l'évolution radiologique est défavorable.

D'autre part, on a vu apparaître chez des malades traités pour asthme ou rhumatisme des poussées septicémiques à staphylocoques (Dubois-Ferrière [32]) ou à streptocoques. Ces cas, rares

il est vrai, incitèrent les expérimentateurs à rechercher de plus amples renseignements physiologiques sur le composé E.

C'est ainsi que l'étude de la cortisone passa de la clinique au domaine expérimental : ce qui est l'inverse du chemin habituellement parcouru.

Au laboratoire, Mogabgab et Thomas reproduisent chez le Lapin traité à la cortisone une septicémie mortelle à streptocoques hémolytiques avec lésions du rein et du myocarde après injection intradermique. Le Lapin non traité ne fait pas d'infection mortelle dans ces conditions [33].

Mêmes résultats dans la tuberculose expérimentale [34]. Sous l'effet de la cortisone, les animaux résistants deviennent sensibles, et les animaux sensibles sont plus gravement atteints. Les lésions sont largement disséminées et la vaccination ne se fait plus (Solotorovsky [35]). De nombreux auteurs confirment cette manière de voir [36]. Seul Lurie [37], travaillant dans des conditions particulières, il est vrai, trouve que la cortisone s'oppose à la dissémination pulmonaire chez le Lapin.

À la suite de ces travaux sur la tuberculose expérimentale et l'infection à streptocoques, l'action de la cortisone ou de l'ACTH a été essayée vis-à-vis de staphylocoques [38], pneumocoques de divers types [39, 40, 41], méningocoques [42], brucelloses [43], des toxines typhoïdiques [44, 45, 47], diphtérique [45, 46], tétanique [47], ainsi que de celle de Shiga [46]. De plus, furent étudiées des infections à rickettsies [48] et à divers virus : vaccine [39], grippe [39, 48, 54], oreillons [49], poliomyélite [50], coxsackie [51], virus de la pneumonie de la Souris [52] et divers virus neurotropes [53].

Ont été aussi étudiées les modifications de structure du syphilome expérimental chez le Lapin [54], l'infection à *Plasmodium berghei* chez la Souris [55], la trypanosomiase chez le Singe [56] et l'effet sur le *Tricophyton mentagrophytes* [58] (4).

Ces très nombreux travaux n'arrivent pas toujours à la même conclusion suivant les auteurs et suivant les animaux utilisés. Néanmoins, dans aucun cas (à l'exception de Lurie) un effet favorable n'a été noté. *Quand la cortisone n'aggrave pas l'infection expérimentale, elle n'a aucune action.*

L'effet défavorable de la cortisone a été solidement établi. Par quel mécanisme se produit-il ?

Les processus les plus divers ont été invoqués, certains même considèrent l'hormone comme un facteur de croissance des

(4) On trouvera une bibliographie abondante dans l'excellente revue faite par Delaunay [57].

virus [50]. D'après Michael et Whorton [58], c'est parce qu'elle est anti-inflammatoire — même en action locale [59] — que la cortisone favorise l'infection. Shapiro et ses collaborateurs ont démontré qu'elle paralyse la défense cellulaire, en inhibant la multiplication des macrophages et la phagocytose [60]. Pour certains, elle s'opposerait aussi à la formation d'anticorps [61]. (C'est ce qui expliquerait son succès dans les maladies de l'allergie), mais cet aspect de son étude est en plein remaniement [62, 63, 64, 65].

Toujours est-il que le bénéfice ressenti par le malade (chute de température, état général amélioré) serait trompeur, puisque cette disparition des symptômes n'est que la conséquence d'une paralysie des réactions de défense.

Dans tout ce qui précède, la cortisone nous a permis d'isoler la part de la réponse de l'organisme à la maladie. Dans la mesure où elle s'oppose à cette réponse, elle soulage le malade de tous ses symptômes douloureux, mais elle peut aussi le mettre dans un état de moindre résistance. Telle serait la conclusion des résultats expérimentaux. Ils viendraient étayer les complications cliniques que nous avons exposées. Disons cependant que les complications graves sont rares, si l'on considère le grand nombre de malades traités par la cortisone [66].

L'expérimentation est venue souligner d'une manière excessive cet aspect défavorable, car il est difficile *a priori* de concilier les effets bienfaisants et nécessaires de la surrénale, avec l'action nocive de son hormone. S'il en était ainsi, répétons-le, les catastrophes cliniques seraient plus nombreuses.

De notre côté, nous avons obtenu, au cours d'une infection expérimentale par *Salmonella typhi*, des résultats opposés suivant les conditions d'administration de la cortisone.



De nombreux traitements surrénaux ont été essayés au cours de la typhoïde (percortène, extrait cortical total, voire même adrénaline) avec des succès divers. Plus récemment, Woodward [67], Smadel et ses collaborateurs [68] ont préconisé l'association de la cortisone avec le chloramphénicol.

Ces derniers auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence, chez la Souris, une action de cette hormone contre l'endotoxine de *Salmonella typhi* ; pour eux, le bienfait clinique ne peut être attribué à une action sur l'agent microbien [44].

Nous avons vu, au début, que la cortisone augmente la résistance de l'animal surrénalectomisé à la toxine de *Salmonella typhi*.

Nous avons montré, par ailleurs [1], qu'il est possible de protéger la Souris normale contre des doses mortelles de *Salmonella*

typhi en lui injectant 2 mg de cortisone une heure avant l'infection. Pour mettre cette protection en évidence, nous avons procédé de la façon suivante :

1° CONDITIONS DE L'INFECTION. — Pour obtenir la mort en vingt-quatre heures de 100 p. 100 des souris, il est nécessaire de leur injecter de très fortes doses de ce germe : soit 1 cm³ par voie sous-cutanée ou 0,25 cm³ par voie intrapéritonéale, d'une culture à la seizième heure en bouillon ordinaire. On peut cependant augmenter considérablement la virulence de ce germe en l'injectant dans le péritoine mélangé à de la mucine.

Quand la Souris reçoit un très grand nombre de germes, un traitement à la cortisone exerce un effet favorable, que l'infection soit faite par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.

Au contraire, vis-à-vis d'un petit nombre de germes injectés avec de la mucine, cette hormone n'a pas d'action, ainsi que le démontre l'expérience suivante :

Tous les animaux traités ont reçu 2 mg de cortisone, par voie sous-cutanée, une heure avant l'infection :

Témoins infectés avec 0,25 cm ³ i-p.	...	1	survie sur 10 souris.
Traités.	...	7	— —
Témoins infectés avec 1 cm ³ s-c.	...	2	— —
Traités.	...	5	— —
Témoins infectés (10 — ⁵ dans la mucine i-p.).	0	—	—
Traités.	0	—	—

La mucine est-elle antagoniste de la cortisone ou bien exalte-t-elle seulement la virulence du germe en paralysant la défense cellulaire et humorale comme le prétend Olitzky [69, 70] ?

Nos expériences nous ont montré que cette substance n'augmente pas la toxicité de l'antigène O et que la cortisone protège d'une même façon les animaux qui reçoivent antigène + mucine et ceux qui ne reçoivent que l'antigène seul.

Antigène de « Salmonella enteritidis » (0,3 mg i-p.) :

Témoins.	...	0	survies sur 20 le 3 ^e jour.
Traitées.	...	11	— —
Témoins + mucine (0,2 mg i-p.).	...	1	— 10 —
Traitées.	...	5	— —

La mucine n'exerce donc pas d'antagonisme direct avec la cortisone puisqu'elle ne s'oppose pas à son action sur l'antigène O.

Avant d'exposer les conditions qui président au traitement hormonal, nous voudrions insister sur le fait suivant : l'action anti-infectieuse de la cortisone semble surtout antitoxique.

a) Elle protège l'animal non surrénalectomisé vis-à-vis des endotoxines de *Salmonella typhi* et de *Salmonella enteritidis* (variété Danyesz). Les expériences suivantes le démontrent.

Toutes les souris traitées ont reçu 2 mg de cortisone par voie sous-cutanée, une heure avant l'antigène.

Antigène de « *Salmonella typhi* » (1 mg i.-p.) :

Témoins.	2	survies sur 40 le 3 ^e jour.
Traitées.	26	— — —

b) La cortisone mise à saturation *in vitro* n'exerce pas d'action antibactérienne vis-à-vis du germe (*Salmonella typhi*, souche Ty II).

c) Si cette hormone exerçait un effet direct sur le germe, elle devrait mieux agir, malgré la présence de mucine, quand l'inoculat est plus faible.

d) La comparaison de son activité avec celle du chloramphénicol paraît suggestive. L'hormone est moins active que l'antibiotique sur le germe, mais plus active sur la toxine.

Pour toutes ces raisons, nous pensons que c'est surtout par son action antitoxique que la cortisone protège la Souris infectée par *Salmonella typhi*.

2° DANS QUELLES CONDITIONS ET A QUELLES DOSES LA CORTISONE AGIT-ELLE LE MIEUX ? — Nous avons dit plus haut que Jackson et Smadel [44] n'ont observé aucune action de la cortisone vis-à-vis de l'endotoxine de *Salmonella typhi*. Ces auteurs ont administré 0,1 à 1,25 mg en deux jours et demi à la Souris. De notre côté, en utilisant leur plus forte dose, nous n'avons pas constaté de différence entre les animaux traités et les témoins. Pour obtenir une protection, il est nécessaire d'utiliser des doses plus élevées. 1 mg une heure avant l'infection suffit parfois, mais 2 mg nous semblent la dose la plus favorable. On n'a pas avantage à la répéter ni à l'augmenter.

La cortisone étant rapidement éliminée, la voie sous-cutanée nous semble la meilleure ; cependant, on peut aussi avoir recours à la voie intrapéritonéale.

Par contre, nous n'avons pu mettre en évidence aucune protection contre la toxine diphtérique [45].

L'action favorable de la cortisone est-elle liée à la nature même des *Salmonella* et de leur endotoxine, ou bien résulte-t-elle des différences des méthodes expérimentales ?

Nous avons récemment signalé [2] comment il est possible, au moyen de la cortisone, de diminuer la résistance de la Souris aux *Salmonella* et à leur endotoxine. Il nous paraît nécessaire de rappeler brièvement ces expériences avant d'aborder certains faits nouveaux qui nous permettent d'entrevoir le mécanisme de cette action paradoxale.

Lorsque l'on injecte à des souris, par voie intrapéritonéale, 1 cm³ de culture diluée au 1/10 dans du liquide de Tyrode, les

animaux témoins sont peu touchés. Par contre, nous avons constaté que dans ces conditions, certains des animaux traités avec de la cortisone (5 mg en deux fois à huit heures d'intervalle) meurent à partir du troisième jour et l'examen de l'exsudat péritonéal montre qu'ils ont succombé à l'infection. Ceci nous

Blanc : *Témoins infectés Ty 2 (10^{-1} i.p.)*

Noir : *Infectés (id.) + Cortisone (2,5mg. x 2 fois)*

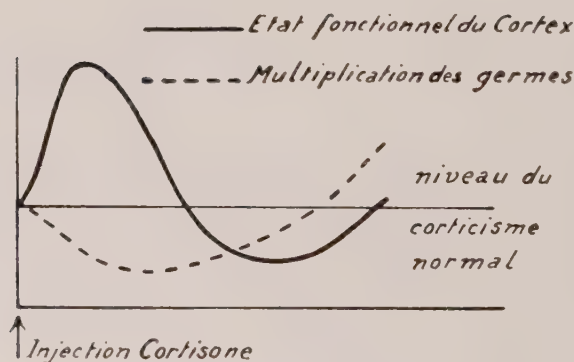
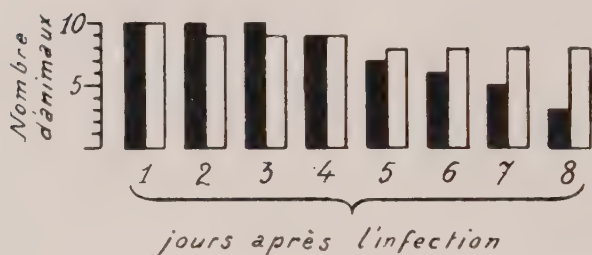


FIG. 1.

a suggéré le schéma suivant : à l'état de résistance qui augmente dans les premières heures et que l'on perçoit nettement dans les expériences où 100 p. 100 des témoins meurent, ferait suite une phase de dépression chez certains des animaux traités. Cet abaissement de la résistance de l'organisme permettrait aux germes de se multiplier [fig. 1] (*).

(*) Nous remercions M^{lle} L. Guyon, qui a exécuté les figures présentées dans ce mémoire.

Pour vérifier cette alternance, tout en évitant les fluctuations expérimentales habituelles quand on utilise le germe vivant, nous avons injecté la toxine.

On sait que 2 mg de cortisone protègent contre une dose mortelle de toxine injectée une heure plus tard. En serait-il autrement si ce traitement précédait de quelques jours l'infection ?

Pour cela, nous avons traité des souris avec 5 mg de cortisone fractionnés en 4 doses et en laissant s'écouler trois jours entre la dernière injection d'hormone et l'administration de 1/10 de la dose mortelle de toxine.

Nous avons ajouté un lot de témoins surrénalectomisés :

Témoin I. 0,5 mg d'antigène O. . .	1	survie sur 10 après 48 h.
Traités cortisone (2 mg 1 h. avant).	5	— —
Témoin II. 0,05 mg d'antigène O. .	14	survies sur 20 après 48 h.
Traités cortisone (5 mg en 4 fois, 3 jours avant)	4	— —
Témoins surrénalectomisés 0,05 mg d'antigène O	0	— —
	(ces 10 souris sont mortes après 3 à 6 h.).	

Quand on considère ce tableau, on remarque que :

1° La cortisone exerce une action favorable dans les premières heures, suivie d'une action nocive dans les jours qui suivent (voir fig. 3, 1).

2° En comparant les témoins qui n'ont plus leur cortex avec les animaux traités trois jours avant l'intoxication, on est tenté de conclure à une surrénalectomie fonctionnelle partielle.

Il semble que par un mécanisme rappelant celui de l'atrophie compensatrice, l'apport exogène de cortisone provoque un hypercorticisme fugace suivi d'hypocorticisme.

Pour nous assurer si tel était le mécanisme de l'action dépressive de la cortisone, nous avons exploré l'état fonctionnel du cortex au moyen de l'épreuve de diurèse provoquée [71, 72].

Cette épreuve consiste à donner par voie intragastrique, à des animaux préalablement privés de nourriture depuis plusieurs heures, un volume d'eau égal à 5 p. 100 de leur poids. Dans ces conditions, l'animal normal élimine la presque totalité de cette eau en moins de deux heures, tandis que chez le surrénalectomisé la diurèse est considérablement ralentie (on sait que la surrénale s'oppose à l'hormone antidiurétique).

De plus, la cortisone exerce une forte action diurétique chez l'animal normal, action qui ne se manifeste pas chez le surrénalectomisé [73].

Cette épreuve utilisée en clinique est un moyen facile d'évaluer, par l'importance de la diurèse, l'état fonctionnel des surrénales.

Dans nos expériences, nous avons choisi des lots de 10 souris pesant environ 20 g et privées de nourriture depuis au moins six heures. On introduit au moyen d'une sonde 1 cm³ d'eau dans leur estomac, puis on les met ensemble dans un bocal de verre sur un matelas de papier filtre sec, préalablement taré. Toutes les trente minutes, on déplace les animaux dans un autre bocal contenant du papier neuf de poids connu. Le volume d'urine éliminé est déduit de l'augmentation du poids du papier.

Par suite de l'évaporation, il y a des variations de poids de

*Effet de la Cortisone et de l'Infection par *Salmonella Typhi* sur la Diurèse*

Chaque courbe représente 10 Souris — La 1^{re} élimination est mesurée 4 heures après l'infection

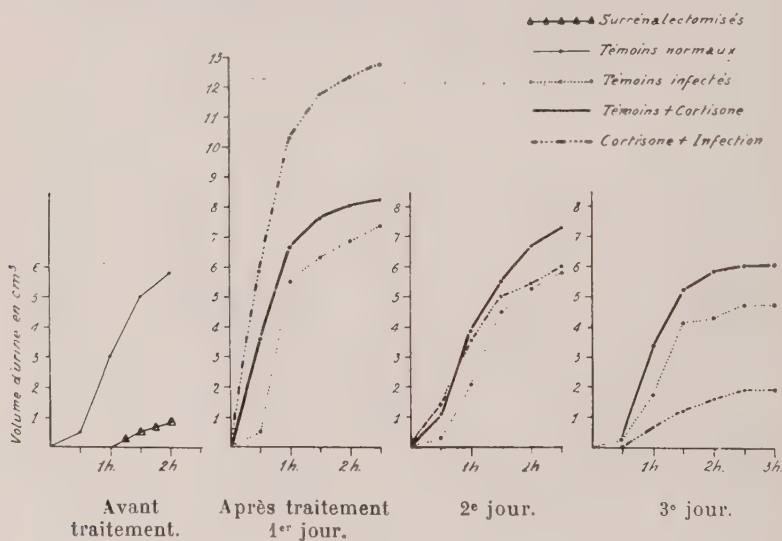


FIG. 2.

10 à 20 p. 100 que nous avons mesurées. Ces variations n'affectent cependant pas, d'une façon significative, l'allure de nos courbes.

Après avoir étalonné par cette méthode, à deux reprises, 3 lots de 10 souris, nous les laissons au repos pendant trois jours avant de commencer l'expérience :

Celle-ci consiste à injecter :

1° Au premier lot : 1 cm³ de culture de *Salmonella typhi* diluée au 1/10 dans du liquide de Tyrode par voie intrapéritonéale.

2° Au deuxième lot : 5 mg de cortisone en deux injections par voie sous-cutanée, à seize heures d'intervalle.

3° Au troisième lot : Même traitement que le deuxième lot et une heure après la deuxième injection de cortisone, on infecte les souris dans les mêmes conditions que celles du premier lot.

La première épreuve est faite quatre heures après l'infection, la deuxième le lendemain et la troisième le troisième jour (fig. 2).

La première épreuve met en évidence l'effet diurétique de la cortisone seule. Il est à remarquer que l'angulation de la première demi-heure (temps de latence avant que la diurèse ne s'établisse) a disparu : la courbe ressemble à celle qu'on obtient dans les cas de diabète insipide.

L'infection seule ne conduit pas à de grosses modifications, mais cortisone + infection donnent lieu à une diurèse considérable : les animaux éliminent un volume d'eau supérieur à celui qui leur a été administré.

Deuxième épreuve : Les 3 courbes se rapprochent de la normale.

Troisième épreuve : Retour à la normale de 2 des courbes. Au contraire, la diurèse du troisième lot (cortisone + infection) est très ralentie. Tout se passe comme si l'on était en présence d'une surrénalectomie fonctionnelle partielle. D'ailleurs, à partir du quatrième jour, certaines souris de ce lot succombent.

Cette expérience vient appuyer la théorie de Selye : stress + cortisone conduit à un hypercorticisme suivi d'hypocorticisme.

Cependant, au moyen de ce test, on ne met en évidence aucun hypocorticisme dû à l'action de la cortisone seule.

Il se peut qu'une diminution de la fonction antitoxique de la surrénale ne retentisse pas sur son rôle régulateur de l'eau, mais il se peut aussi que le « fléchissement » secondaire de la résistance, constaté lors des infections, soit indépendant de l'activité sécrétoire de cette glande.

Si l'augmentation de la sensibilité produite par la cortisone était provoquée par un blocage de l'hypophyse qui conduit à de l'hypocorticisme, l'administration simultanée d'hormone corticotrope (ACTH) devrait s'y opposer. Or il n'en est rien. 10 mg d'ACTH (injectés en cinq fois) ne diminuent pas l'effet nocif de 5 mg de cortisone injectés quarante-huit heures avant 1/10 de dose mortelle d'antigène (fig. 3, 2).

De plus, 2,5 mg de cortisone protègent l'animal surrénalectomisé contre une dose mortelle de toxine injectée une heure plus tard (fig. 3, 4). Cependant, cette même dose d'hormone n'exerce plus aucune action si l'animal a été traité pendant les jours précédents par 1 mg deux fois par jour (fig. 3, 3).

L'examen de ce tableau démontre :

1° La cortisone ne neutralise pas la toxine par une action directe. S'il en était ainsi, 2 mg de cortisone injectés une heure

avant l'antigène protégeraient également les souris ayant reçu l'hormone trois jours au préalable (fig. 3, 3).

2° La dépression secondaire de la résistance n'est pas due à de l'hypocorticisme, puisque ni ACTH ni une nouvelle dose de

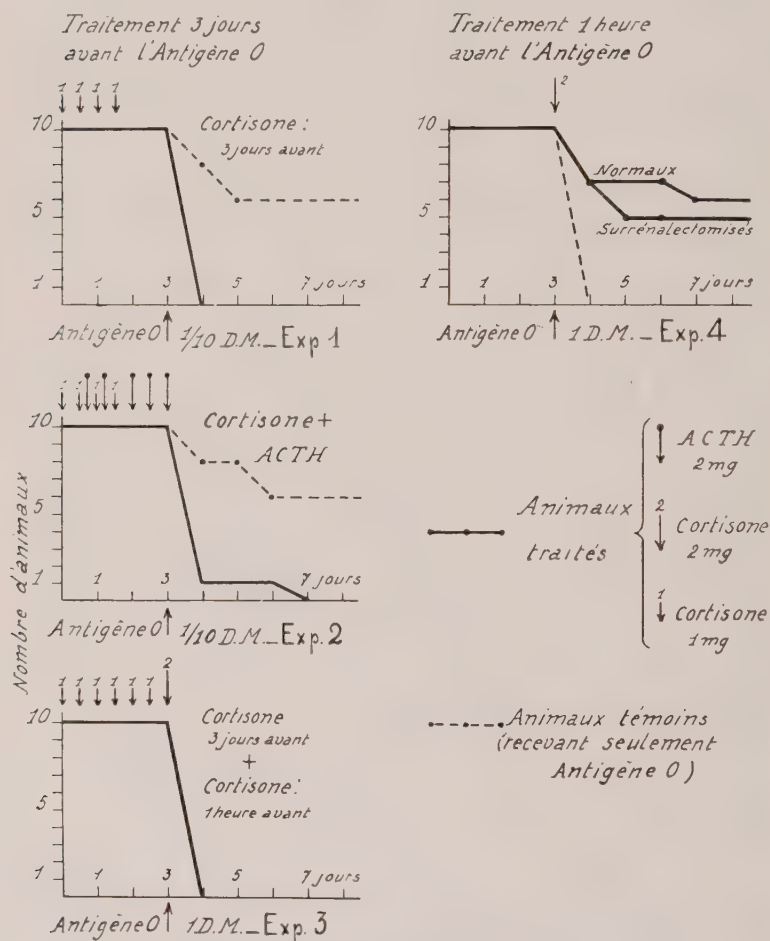


FIG. 3.

cortisone n'arrivent à s'y opposer, tandis que chez l'animal surrénalectomisé, la cortisone exerce toute son action.

Nous tenterons, au moment de la discussion, d'interpréter ces faits, mais nous voudrions d'abord compléter cette étude de la surrénale en exposant certains résultats obtenus avec l'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) et la progestérone.

ACTION DE LA DOCA

VIS-A-VIS DE L'ENDOTOXINE DE *Salmonella enteritidis*.

1° Tant chez l'animal surrénalectomisé que chez l'animal normal, nous n'avons pu mettre en évidence aucune action protectrice de la DOCA, même en utilisant de très fortes doses (1 à 3 mg).

2° Au contraire, elle diminue la résistance de l'animal normal qui, après un traitement de trois jours (1 mg deux fois par jour), succombe quand on lui injecte une dose d'antigène non mortelle pour les témoins.

ACTION DE LA PROGESTÉRONE

VIS-A-VIS DE L'ENDOTOXINE DE *Salmonella enteritidis*.

Par analogie avec la DOCA nous avons essayé la progestérone.

On connaît la ressemblance structurale et même physiologique de ces deux produits [74]. Les effets de la surrénalectomie disparaissent pendant la gestation chez la Chienne. D'autre part, la DOCA peut suppléer à l'absence de corps jaune durant la grossesse, comme l'a montré R. Courrier [75]. Enfin, on a isolé la progestérone de la surrénale.

Des essais préliminaires nous ont montré que l'hormone lutéinique rend l'animal plus sensible à l'antigène O, comme le démontre l'expérience suivante (19 février 1952).

Dix souris témoins reçoivent une dose non mortelle (0,025 mg) d'antigène O par voie intrapéritonéale. Elles sont toutes vivantes dix jours plus tard.

Dix souris reçoivent la même dose de toxine, une heure après l'injection sous-cutanée de 5 mg de progestérone : 6 de ces animaux succombent en vingt-quatre heures et 3 seulement survivent au dixième jour.

Cette expérience répétée sur deux lots de souris de sexe différent nous a donné le même résultat.

Par conséquent, 5 mg de progestérone en une seule injection diminuent la résistance de la Souris à l'endotoxine de *Salmonella enteritidis*.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Dans la résistance de l'organisme aux divers agents toxiques, la surrénale joue un rôle très important. De sa présence dépend la survie de l'animal et l'injection de certaines hormones corticales influencent, de façon décisive, l'évolution d'une infection. Cette action, bien que constante, mène parfois à des effets contradictoires et l'administration d'une même hormone peut conduire à des résultats opposés. Aussi, avant d'interpréter nos propres

expériences, y a-t-il lieu de souligner certains faits importants qui ont été solidement établis. Ceux-ci sont les suivants :

1° *La surrénalectomie abaisse la résistance.* — L'animal, privé de son cortex surrénalien, est toujours plus sensible, bien qu'à des degrés divers, à l'action toxique de différents agents pathogènes. A l'exception de Smith et de ses collaborateurs — qui ont trouvé que la surrénalectomie exerce un effet favorable sur l'évolution du virus de la pneumonie de la Souris [52] — les auteurs sont unanimes à ce sujet.

2° *L'absence de la surrénale est compensée par diverses hormones corticales.* — Aussi bien l'extrait total [14] que les composés A [15, 16] ou E [15, 17] exercent une action favorable chez l'animal surrénalectomisé.

3° *Chez l'animal non surrénalectomisé, ces différentes hormones ne renforcent pas la résistance. Elles peuvent même être nocives.* — Des effets défavorables au cours d'infections expérimentales nombreuses ont été établis avec la DOCA [54], l'extrait total [41], le composé A [16], la progestérone [54], ainsi qu'avec la cortisone et l'ACTH (sur lesquels nous avons longuement insisté).

Il apparaît donc que l'on ne puisse déceler l'action antitoxique ou anti-infectieuse d'une hormone chez l'animal surrénalectomisé. Ce dernier, en effet, est dans un tel état de déficience qu'il est possible de lui rendre sa résistance habituelle, sans toutefois exercer d'action antitoxique spécifique.

4° *Nous avons mis en évidence l'action antitoxique de la cortisone chez l'animal normal.* — Nous avons signalé, au cours de notre exposé, certains travaux qui mettent en évidence l'action antitoxique de divers produits surrénaliens chez l'animal normal [18, 19, 20]. Plus récemment, Beck [21] est parvenu à protéger au moyen de la cortisone des souris contre des doses mortelles de produits anticancéreux.

La dose et le moment d'injection de la cortisone, ainsi que la sévérité de l'infection, sont des facteurs très importants.

L'action de la cortisone est différente de celle des antibiotiques. Elle ne fait que renforcer le « terrain », aussi est-elle inopérante si l'on infecte l'animal avec un grand nombre de doses mortelles.

Si, pour mettre en évidence l'action de la cortisone, il ne faut pas injecter plus d'une ou deux doses mortelles, il faut cependant avoir recours à des expériences où 100 p. 100 des témoins meurent. Or, la majorité des auteurs ayant traité ce sujet décrivent des infections expérimentales dans lesquelles les témoins ne sont que peu ou pas touchés. Ce fait a sans doute son importance.

Il est possible, en changeant les conditions d'administration du composé E, de rendre les animaux traités moins résistants.

Shwartzman attribue l'effet nocif de la cortisone à ce qu'elle

empêche (par relais hypophysaire) la surrénale de sécréter une substance anti-infectieuse [50]. Cette hypothèse a été rejetée par certains auteurs [41, 53] qui remarquent avec raison que l'ACTH provoque les mêmes effets défavorables. Nos résultats s'opposent aussi à cette théorie puisque nous trouvons que la cortisone possède une action antitoxique chez l'animal normal. Propriété qui s'observe même en l'absence de surrénale.

L'hypocorticisme n'est pas responsable de cette dépression puisque ni ACTH, ni une nouvelle dose de cortisone, ne s'opposent à cet abaissement de la résistance qui survient secondairement (Cf. fig. 3, 2 et 3).

Comment interpréter cette action du composé E tour à tour anti- ou pro-infectieux ?

Il nous semble que la cortisone ne neutralise pas directement la toxine, mais par l'intermédiaire d'un récepteur qu'elle serait capable de stimuler.

Le schéma de ce mécanisme pourrait être le suivant :

L'introduction d'une toxine dans l'organisme stimulerait la surrénale par l'intermédiaire de l'hypophyse et cette hypercortinémie agirait à son tour sur une « réserve antitoxique ». Aussi les animaux surrénalectomisés étant incapables d'exciter ce récepteur meurent-ils avec une « réserve » intacte.

Au contraire, les animaux préalablement traités par la cortisone ont épuisé ce tissu qui n'a pas eu le temps de se renouveler. Ces animaux succombent, même si on leur fournit une nouvelle dose d'hormone, leur « réserve » ayant été entièrement utilisée. La similitude de leur comportement avec celui des surrénalectomisés ne serait donc qu'apparente.

Ce schéma, malgré ses lacunes et ses imperfections, rend compte des contradictions que nous avons soulignées plus haut. Toutefois, les résultats exposés permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° La cortisone possède une action antitoxique marquée.

2° Cette hormone ne neutralise pas directement le poison microbien, mais agit vraisemblablement sur un récepteur périphérique qui est capable de s'opposer à l'action de la toxine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. CHEDID, F. BOYER et M. SAVIARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 713.
- [2] L. CHEDID et F. BOYER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952 (sous presse).
- [3] T. REICHSTEIN. *Chimie et Industrie*, 1951, **66**, 323.
- [4] H. SELYE. *Endocrinology*, 1937, **21**, 169.
- [5] C. A. GEMZELL, D. C. VAN DYKE, C. A. TOBIAS et H. M. EVANS. *J. A. M. A.*, 1952, **148**, 311.
- [6] E. TONUTTI. *Klin. Wochenschr.*, 1949, **27**, 569.

- [7] E. TONUTTI. *Klin. Wochenschr.*, 1950, **28**, 137.
- [8] E. TONUTTI. *Ann. d'Endocr.*, 1951, **42**, 481.
- [9] O. PERLA et J. MARMORSTON-GOTTESMAN. *Natural Resistance a. Clin. Med.*, p. 475 et suiv.
- [10] J. MARMORSTON-GOTTESMAN et O. PERLA. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1931, **28**, 648.
- [11] J. MARMORSTON-GOTTESMAN et O. PERLA. *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 109.
- [12] C. W. JUNGBLUT. *J. Bact.*, 1934, **27**, 81.
- [13] M. M. STEINBACH. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1929, **27**, 142.
- [14] L. A. LEWIS et I. H. PAGE. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1946, **31**, 1325.
- [15] L. A. LEWIS et I. H. PAGE. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, **50**, 547.
- [16] A. DELAUNAY et J. LEBRUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 1669.
- [17] A. DELAUNAY et J. LEBRUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1698.
- [18] R. L. ZWEMER et C. W. JUNGBLUT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1935, **32**, 1583.
- [19] W. G. CLARK et R. H. BARNES. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **44**, 340.
- [20] D. J. INGLE. *Am. J. Physiol.*, 1944, **142**, 191.
- [21] L. V. BECK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **78**, 392.
- [22] R. JEANLOZ. *Bull. Soc. Chim. de Fr.*, 1950, **17**, 67.
- [23] *Cortisone Produced from Tropical Plants in Mexico* (anonyme). *J. A. M. A.*, 1950, **147**, 684.
- [24] D. J. INGLE. *J. Clin. Endocr.*, 1950, **10**, 1312.
- [25] L. A. LEWIS et I. H. PAGE. *Am. J. Physiol.*, 1948, **153**, 148.
- [26] B. SOYLEMEZOGLU et J. A. WELLS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **77**, 43.
- [27] H. P. ROME et C. J. BRACELAND. *J. A. M. A.*, 1952, **148**, 27.
- [28] E. C. KENDALL. *Lancet*, 1951, **2**, 586.
- [29] S. R. MACH. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1951, **81**, 155.
- [30] L. FRED, MELVIN H. LEVIN, S. B. RIVO et T. F. BARNETT. *J. A. M. A.*, 1951, **147**, 242.
- [31] C. LE MAISTRE. *J. Clin. Invest.*, 1951, **30**, 445.
- [32] H. DUBOIS-FERRIÈRE. *Presse Méd.*, 1951, **22**, 442.
- [33] W. I. MOGABGAB et L. THOMAS. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1950, **36**, 968.
- [34] P. D'ARCY-HART et C. R. J. W. REES. *Lancet*, 1950, **2**, 391.
- [35] M. SOLOTOROVSKY, F. S. GREGORY et H. C. STOERK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 286.
- [36] D. M. SPAIN et N. MOLOMUT. *Am. Rev. Tub.*, 1950, **62**, 337.
- [37] M. B. LURIE, P. ZAPPASODI, A. M. DAUNENBERG et I. B. SWARTS. *Science*, 1951, **113**, 234.
- [38] A. M. KLIGMAN, G. D. BALBRIDGE, G. REBELL et D. M. PILLEBURY. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1951, **37**, 615.
- [39] E. H. KASS, S. H. INGBAR et M. FINLAND. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1951, **37**, 780.
- [40] B. J. GLASER. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1951, **36**, 826.
- [41] C. CAVALLERO, A. DI MARCO et G. SALA. *Arch. Int. Pharmac. Therap.*, 1952, **89**, 82.
- [42] L. THOMAS et R. A. GOOD. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 604.
- [43] R. ABERNATHY. *J. Clin. Investig.*, 1951, **30**, 623.
- [44] E. B. JACKSON et J. E. SMADEL. *Bacteriol. Proc.*, 1950, 92.

- [45] F. BOYER et L. CHEDID. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1232.
- [46] R. MURRAY et S. E. BRANHAME. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **78**, 750.
- [47] S. SPECTOR et R. D. MERCER. *J. Infect. Dis.*, 1951, **89**, 224.
- [48] KASS, NEVA et FINLAND. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 560.
- [49] E. D. KILLBOURNE et F. L. HORSFALL Jr. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 116.
- [50] G. SHWARTZMAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **75**, 835.
- [51] E. D. KILLBOURNE et F. L. HORSFALL Jr. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **77**, 135.
- [52] J. M. SMITH, J. S. MURPHY et G. S. MIRICK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **78**, 505.
- [53] C. M. SOUTHAM et V. S. BABCOCK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, **78**, 105.
- [54] TURNER et HOLLANDER. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1950, **87**, 505.
- [55] G. M. FINDLAY et E. M. HOWARD. *Nature*, 1952, **169**, 547.
- [56] A. WOLF, E. A. KABAT, E. A. BEZER et J. FONSECA. *Fed. Proc.*, 1951, **10**, 375.
- [57] A. DELAUNAY. *Presse Méd.*, 1951, **59**, 1455.
- [58] M. MICHAEL Jr. et C. M. WHORTON. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 754.
- [59] R. SHAPIRO, B. TAYLOR et M. TANBENLANS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 854.
- [60] S. B. CREPEA, G. E. MAGNIN et C. V. SEASTONE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **77**, 704.
- [61] F. G. GERMUTH et B. OTTINGER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 815.
- [62] T. F. DOUGHERTY, A. WHITE et J. H. CHASE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **56**, 28.
- [63] H. C. STOERK et M. SOLOTOROVSKY. *Am. J. Path.*, 1950, **26**, 708.
- [64] A. ASCOKENASY, A. BUSSARD, P. CORVAZIER et P. GRABAR. *Rev. Hematol.*, 1950, **5**, 107.
- [65] E. E. FISCHER, H. C. STOERK et M. BJORNEBOE. *Fed. Proc.*, 1951, **10**, 408.
- [66] E. O. HAHN, H. B. HOUSER, C. H. RAMMELKAMP Jr, F. W. DENNY et L. W. WANNAMAKER. *J. Clin. Invest.*, 1951, **30**, 274.
- [67] T. E. WOODWARD, H. E. HALL, R. D. RIVERA, J. A. HIGHTOWER, MARTINEZ et R. PARKER. *Ann. Int. Med.*, 1951, **34**, 10.
- [68] J. E. SMADEL, H. L. LEY et F. H. DIRKS. *Ann. Int. Med.*, 1951, **34**, 1.
- [69] L. OLITZKI, M. SHELUBSKY et E. EFRATI. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **64**, 258.
- [70] L. OLITZKI et KOCH. *J. Immunol.*, 1945, **20**, 229.
- [71] R. GAUNT, J. H. BIRNIE, et W. J. EVERSOLE. *Physiol. Rev.*, 1949, **29**, 281.
- [72] A. J. SLESSOR. *Clin. Endocr.*, 1951, **11**, 700.
- [73] F. MOREL. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, séance du 9 février.
- [74] R. COURRIER. *Endocrinologie de la Gestation*. Masson, Paris, 1945.
- [75] R. COURRIER. *Ann. d'Endocrinologie*, 1939, **1**, 533.

L'UTILISATION DU CARDIOLIPIDE ET DE LA LÉCITHINE DANS LA PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE POUR LA RÉACTION DE CLARIFICATION DE MEINICKE (M. K. R. II.)

par M. FAURE et R. PAUTRIZEL. (*)

*(Institut Pasteur, Paris,
et Centre de Prophylaxie antivénérienne, Bordeaux.)*

L'utilisation du cardiolipide de Pangborn [1] associé à la lécithine a permis de remplacer les extraits de muscle cardiaque dans la préparation de divers antigènes destinés au sérodiagnostic de la syphilis par les réactions de fixation du complément [2, 3] ou de floculation [4, 5, 6, 7] (1). Les antigènes à base de phosphatides purifiés présentent sur les préparations empiriques plusieurs avantages : sensibilité plus élevée, spécificité plus grande, identité des divers lots fabriqués et excellente conservation.

Dans ce travail, nous exposons comment on peut remplacer les extraits alcooliques de muscle cardiaque par du cardiolipide et de la lécithine en les associant à du baume de Tolu pour préparer un antigène pour la réaction de clarification de Meinicke (M. K. R. II).

Pour être utilisable, cet antigène doit posséder deux qualités : donner, avec une solution aqueuse de chlorure de sodium à 3,5 p. 100, une suspension homogène même après un chauffage de deux minutes à 56° ; fournir une suspension qui, mélangée avec un sérum humain, reste stable si ce sérum ne renferme pas de réagine syphilitique et, au contraire, floccule si le sérum contient cette réagine. Nous avons étudié successivement les deux parties physico-chimique et sérologique de cette question.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 avril 1952.

(1) Cette bibliographie n'a nullement la prétention d'être complète ; elle ne mentionne que quelques exemples de l'utilisation du cardiolipide.

I. — ETUDE DE LA MISE EN SUSPENSION DU BAUME DE TOLU EN PRÉSENCE DE LÉCITHINE ET DE CARDIOLIPIDE.

Nous avons utilisé une solution de baume de Tolu à 12,5 p. 1 000 dans de l'alcool à 95°. Ce baume est mis en suspension dans une solution aqueuse de ClNa à 3,5 p. 100 selon la méthode habituelle : 1 volume de la solution alcoolique de baume et 10 volumes de la solution aqueuse de ClNa sont chauffés à 56° dans deux récipients séparés; la solution aqueuse est versée dans la solution alcoolique; le mélange est homogénéisé par deux autres transvasements, puis il est maintenu à 56° pendant deux minutes.

Le baume de Tolu utilisé seul ne permet pas d'obtenir par cette technique une suspension stable. Au contact de la solution saline, les éléments de la résine flocculent, puis vont adhérer aux parois du récipient abandonnant une solution aqueuse presque limpide. Nous avons étudié successivement l'action émulsionnante de la lécithine d'œuf, du cardiolipide et des mélanges de cardiolipide-lécithine (2) sur le baume de Tolu en introduisant des quantités variables de ces phosphatides dans la solution alcoolique de baume de Tolu à 12,5 p. 1 000.

Etudiant l'action de concentrations croissantes de lécithine de 0,05 à 2 p. 1 000, nous avons observé que cette substance possède une grande activité émulsionnante vis-à-vis du baume de Tolu. Lorsque la quantité de lécithine augmente, la suspension devient de plus en plus stable, sa turbidité croît, atteint un maximum pour une concentration de 0,4-0,5 p. 1 000, puis diminue en donnant des solutions colloïdales de plus en plus transparentes.

Les mêmes essais effectués avec le cardiolipide montrent que cette substance ne possède aucun pouvoir émulsionnant vis-à-vis du baume de Tolu. A l'inverse de la lécithine, plus on ajoute de cardiolipide au baume, plus on accélère sa floculation dans la solution saline.

Pour obtenir des suspensions de baume stables contenant du cardiolipide et de la lécithine, il est nécessaire d'introduire un excès de lécithine afin de compenser l'action floculante du cardiolipide. Il faut utiliser une quantité de lécithine telle qu'à elle seule, elle donne avec le baume une suspension présentant un léger aspect colloïdal. Si on introduit une quantité de lécithine donnant avec le baume une suspension stable, mais très opaque, l'addition de cardiolipide entraîne la floculation de la suspension.

(2) Ces substances ont été préparées selon les techniques décrites dans [8] et [9].

II. — ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES DES SUSPENSIONS DE BAUME-LÉCITHINE-CARDIOLIPIDE.

Les réactions sérologiques ont été faites selon la technique habituelle : 0,2 cm³ de sérum est additionné de 0,5 cm³ de la suspension aussitôt après sa préparation. Dans cette partie du travail, la lecture des résultats a été effectuée par l'observation du contenu des tubes de réaction après un séjour de seize à dix-huit heures à la température du laboratoire (20° environ).

Les suspensions stables de baume ne contenant que de la lécithine floclent tant en présence des sérums des sujets syphilitiques que des sujets non syphilitiques. Elles ne permettent pas de faire de distinction entre ces deux catégories de sérums.

Il n'est pas possible d'étudier l'activité sérologique du cardiolipide en l'absence de lécithine puisque ce composé ne permet pas d'obtenir des suspensions stables de baume.

Nous avons alors étudié l'activité sérologique de suspensions contenant une quantité constante de lécithine et des quantités variables de cardiolipide :

Baume. . . .	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	} p. 1 000
Lécithine . .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Cardiolipide .	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	

Si la quantité de cardiolipide est faible (0,05 p. 1 000), les sérums normaux et syphilitiques floclent. Lorsque la concentration du cardiolipide est plus grande (0,10), la suspension ne floclé plus avec les sérums normaux et floclé avec les sérums des sujets syphilitiques. Si l'on augmente encore la quantité de cardiolipide (0,15), la réaction devient plus sensible tout en demeurant spécifique. En présence de 0,20, puis 0,25 p. 1 000 de cardiolipide, la sensibilité de la réaction diminue et, par ailleurs, il se forme de petits dépôts dans les sérums normaux. Enfin les suspensions contenant 0,30 et plus de cardiolipide sont instables.

L'étude d'une série de mélanges contenant une quantité constante de cardiolipide et des quantités variables de lécithine nous a donné des résultats analogues.

Baume. . . .	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	} p. 1 000
Lécithine . .	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	
Cardiolipide .	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	

Si la quantité de lécithine est faible (0,3 p. 1 000), la suspension est instable. Lorsque la concentration de la lécithine est plus grande (0,4), on observe une flocculation intense de la suspension en présence des sérums des sujets syphilitiques et un petit dépôt seulement au fond des tubes contenant les sérums normaux. Si

l'on augmente encore la quantité de lécithine (0,5 — 0,6), la réaction devient moins sensible mais très spécifique. Enfin, les suspensions contenant 0,7 et 0,8 p. 1 000 de lécithine donnent de petits dépôts en présence des sérums normaux.

On voit donc que pour préparer un antigène utilisable dans la réaction de Meinicke, il est nécessaire d'ajouter au baume de Tolu, de la lécithine et du cardioliipide ; la lécithine joue le rôle d'émulsionnant vis-à-vis du baume et le cardioliipide confère à la suspension sa spécificité sérologique.

L'addition de cardioliipide au mélange baume-lécithine est doublement nécessaire : d'une part, cette substance empêche la floculation de la suspension au contact des sérums normaux, et, d'autre part, elle provoque cette floculation en présence des sérums des sujets syphilitiques.

En faisant varier les proportions relatives de lécithine et de cardioliipide, on peut modifier la sensibilité des antigènes préparés. Des faits analogues ont été observés lors de l'étude des antigènes à base de cardioliipide-lécithine destinés à d'autres réactions sérologiques de la syphilis, mais, dans le cas présent, les variations de la sensibilité en fonction de la composition du mélange sont particulièrement marquées et la spécificité de l'antigène n'est obtenue qu'entre des limites très étroites de cette composition.

Les études que nous venons de décrire ont été effectuées avec une même solution de baume A. Nous avons fait des essais analogues avec 5 autres lots de baume de Tolu et nous avons obtenu, avec 4 d'entre eux, des résultats comparables.

Cependant, ces divers baumes n'étant pas identiques, nous avons observé que pour préparer des antigènes possédant les mêmes propriétés sérologiques de sensibilité et de spécificité, il est nécessaire d'établir pour chacun d'eux une formule particulière :

	LOT DE BAUME				
	A	B	C	D	E
Baume	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Lécithine	0,45	0,6	0,5	0,3	0,6
Cardioliipide.	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

p. 1 000

Avec l'un des échantillons de baume, nous ne sommes pas parvenus à préparer un antigène utilisable.

Avec ces antigènes préparés avec du cardioliipide et de la lécithine, on peut également effectuer la réaction de Meinicke selon ses autres modalités : examen au microscope de la floculation produite dans 1 goutte des mélanges sérum-suspension déposée sur une lame de verre et maintenue pendant une heure dans une chambre humide ; observation à l'aide d'une loupe ou d'un miroir grossissant de l'aspect floculé ou non du contenu des tubes après une heure

et demie à la température du laboratoire ; utilisation comparative des suspensions dites neutre et alcaline. La suspension dite neutre obtenue dans la solution de chlorure de sodium à 3,5 p. 100 possède un pH à 3,5 ; la suspension dite alcaline préparée avec la même solution de chlorure de sodium additionnée de 1 p. 10 000 de carbonate de sodium présente un pH à 5.

III. — ETUDE COMPARATIVE DE LA VALEUR SÉROLOGIQUE DE L'ANTIGÈNE POUR LA RÉACTION DE MEINICKE ET D'AUTRES ANTIGÈNES A BASE DE CARDIOLIPIDE-LÉCITHINE.

Afin de connaître la valeur sérologique de notre antigène pour la réaction de Meinicke préparé selon la formule : Baume A 12,5. Lécithine 0,45, Cardiolipide 0,15 p. 1 000, nous avons examiné une série de 919 sérums comparativement à l'aide des réactions de Kline, du V. D. R. L. et de Kolmer. Nous avons fait, en outre, un titrage de la réagine contenue dans ces sérums à l'aide de la technique de Kline.

Les antigènes utilisés pour effectuer cette comparaison répondaient aux formules suivantes :

	KLINE	V. D. R. L.	KOLMER	
Cardiolipide	2	0,5	0,2	} p. 1 000
Lécithine	15	2,5	1	
Cholestérol.	»	9	4	

700 sérums ont donné des résultats négatifs avec toutes les réactions et 116 sérums des résultats positifs avec les 4 mêmes réactions.

103 sérums ont donné des résultats dissociés. 84 d'entre eux avaient un titre en réagine égal ou inférieur à 1 et, de ce fait, se trouvaient dans le voisinage de la sensibilité limite des divers antigènes. 15 autres sérums avaient un titre en réagine de 1/2 : 5 sérums seulement ont donné une réaction de Meinicke négative, alors que les 3 autres réactions étaient positives, et 4 sérums ont donné des réactions de Meinicke positives et du V. D. R. L. négatives. 2 sérums possédant des titres élevés en réagine (1/32 et 1/128) ont donné des résultats négatifs avec la réaction de Meinicke et positifs avec les 3 autres réactions.

Ces résultats montrent donc que notre préparation d'antigène pour la réaction de Meinicke possède une bonne spécificité sérologique, mais qu'il est, dans l'ensemble, un peu moins sensible que les autres antigènes à base de cardiolipide-lécithine avec lesquels nous l'avons comparé ; par ailleurs, il paraît plus sensible au phénomène de zone en présence des sérums riches en réagine que ces autres antigènes.

DISCUSSION.

L'emploi de cardiolipide et de lécithine dans la préparation de l'antigène pour la réaction de Meinicke permet de régler commodément la sensibilité des solutions antigéniques. Comme les divers lots de fabrication de ces phosphatides purifiés possèdent des propriétés sérologiques identiques, on peut préparer, à partir d'un même baume de Tolu, des lots d'antigènes possédant eux-mêmes des propriétés sérologiques identiques si on mélange les trois constituants dans les mêmes proportions. Cependant, du fait de l'introduction, dans cette solution, d'un produit biologique brut mal défini et variable d'un lot à un autre, il n'est pas possible d'envisager une véritable normalisation de cet antigène en précisant sa composition pondérale. Cette normalisation, au contraire, est possible dans le cas des antigènes à base de cardiolipide-lécithine-cholestérol. Par ailleurs, la présente étude de l'antigène pour la réaction de Meinicke nous a montré combien ses propriétés sérologiques sont sensibles à de faibles variations de sa composition et, en particulier, combien sont étroites les limites de composition entre lesquelles cet antigène est spécifique.

Ces faits nous conduisent à préférer à l'emploi de l'antigène pour la réaction de Meinicke, l'utilisation d'antigènes mieux définis et plus stables constitués par du cardiolipide, de la lécithine et du cholestérol comme, par exemple, l'antigène pour la réaction de Kline qui, par ailleurs, présente l'avantage d'être peu sensible au phénomène de zone sous l'action de grandes quantités de réagine.

La réaction de Meinicke doit une grande partie de sa vogue au fait que, étant exécutée dans un milieu riche en chlorure de sodium, elle se pratique avec des sérums sanguins non chauffés au préalable à 56° ; mais cet avantage, dû à l'emploi d'une solution hypertonique, n'est pas un privilège de cette réaction. Des essais en cours semblent montrer que l'on peut également appliquer avec succès ce même procédé à la réaction de Kline.

EN RÉSUMÉ, on peut remplacer dans la préparation de l'antigène pour la réaction de Meinicke, l'extrait alcoolique de cœur par du cardiolipide et de la lécithine. L'utilisation de ces phosphatides purifiés permet de régler aisément la sensibilité de ces antigènes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. C. PANGBORN. *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 247 ; Cardiolipin antigen. W. H. O., Genève, 1951.
- [2] E. MALTANER et F. MALTANER. *J. Immunol.*, 1945, **51**, 195.
- [3] Ad. HARRIS et J. PORTNOY. *J. Ven. Dis. Inform.*, 1944, **25**, 253.
- [4] R. BROWN. *J. Bact.*, 1944, **47**, 581.

- [5] B. S. KLINE. *Am. J. Clin. Path.*, 1946, **416**, 68.
- [6] A. HARRIS, A. A. ROSENBERG et L. M. RIEDEL. *J. Ven. Dis. Inform.*, 1946, **27**, 169.
- [7] R. L. KAHN, E. B. MC DERMOTT, S. MARCUS, A. H. WHEELER et E. M. BRANDON. *Univ. Hosp. Bull. Michigan, Ann Arbor*, 1946, **42**, 81.
- [8] M. FAURE et M.-J. COULON. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 533.
- [9] M. FAURE. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 503.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DES SOUCHES DE PESTE « SAUVAGE » DU KURDISTAN

par M. BALTAZARD et P. ASLANI (*).

(Institut Pasteur de l'Iran. Téhéran.)

Nous avons récemment rapporté les résultats de l'enquête poursuivie pendant quatre années dans le foyer de peste du Kurdistan par l'équipe de recherche de l'Institut Pasteur de l'Iran [1].

Au cours de cette enquête nous avons isolé 73 souches de peste, soit :

4 souches isolées de l'homme,

3 souches isolées de puces de rongeurs.

61 souches isolées de mérions (*Meriones persicus persicus*, *M. libycus erythroua*, *M. shawi tristrami*),

3 souches isolées de gerboises (*Allactaga williamsi*),

1 souche isolée d'une belette (*Mustela altaïca*),

1 souche isolée d'un rat-taupe (*Ellobius lutescens*).

L'origine exacte de ces souches a été donnée dans notre précédent travail ; leur point précis d'isolement peut être trouvé sur la carte 3, annexée à ce travail [1].

Nous avons suivi, pour l'identification biochimique de ces souches, les conseils de R. Pollitzer, de la Section de Coordination des Recherches de l'OMS, qui a bien voulu nous remettre une copie de sa note de documentation au Comité d'Experts de la Peste de l'OMS [2].

I. — TECHNIQUES.

La recherche des caractères biochimiques : fermentation de la glycérine, fermentation du rhamnose, production d'acide nitreux, réduction des nitrates en nitrites, a été faite pour les 73 souches après des temps variés d'isolement et de conservation au laboratoire (quatre ans à huit jours). Toutes les souches anciennes, sorties de glacière, ont été, avant examen, passées sur le cobaye pour contrôle et examen de la virulence.

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 8 mai 1952.

(1) Nous avons utilisé, pour notre part, la peptone Chapotcaut.

La recherche de la fermentation de la glycérine et du rhamnose a été faite selon la technique utilisée par Chen [3] sur les indications de R. Pollitzer et de K. F. Meyer et recommandée par Pollitzer dans sa note [2] comme technique standard. Le milieu est l'eau peptonée (1 p. 100 de peptone (1) en eau distillée) à laquelle on ajoute glycérine ou rhamnose dans la proportion de 1 p. 100. L'indicateur est la fuchsine acide : indicateur d'Andrade (fuchsine acide : 0,20 g, eau distillée : 100 cm³), ajouté au milieu dans la proportion de 1 p. 100. Après stérilisation (une heure, à 105° C seulement pour éviter la caramélisation) le pH de ces milieux est très soigneusement ajusté à 7,40.

Deux tubes au moins de chaque milieu sont ensemencés largement avec le produit de raclage (4 anses) d'une culture de quarante-huit heures sur gélose ordinaire de la souche à examiner et portés à l'étuve à 37° C (2). Les tubes sont agités pour aération tous les jours et suivis pendant vingt et un jours. La pousse du bacille dans le milieu est estimée tous les jours par néphélométrie et notée en même temps que le virage de la couleur du milieu. Des subcultures sont faites chaque semaine pour vérifier la vitalité des germes.

Pour la recherche de la production d'acide nitreux, et de la réduction des nitrates en nitrites, les techniques sont moins bien fixées. Pollitzer [2] recommande, pour la seconde de ces recherches, la technique de Petagnani [4], ce qui est inexact, cet auteur ayant seulement décrit une technique de recherche de la production par le bacille pesteux d'acide nitreux en bouillon de foie ordinaire, non additionné de nitrates. Cette technique de Petagnani étant par ailleurs décrite d'une manière peu précise nous avons, pour notre part, fixé les modes de recherche suivants, d'après les indications de R. Pollitzer.

Le milieu utilisé est le bouillon de foie (foie de veau : 500 g, peptone Chapoteaut : 10 g, NaCl : 5 g), pH ajusté à 7,5, employé tel pour la recherche de la production d'acide nitreux. Pour la recherche de la réduction des nitrates en nitrites, le bouillon de foie est additionné de nitrate de potasse dans la proportion de 1 p. 100. Deux tubes au moins de chaque milieu sont ensemencés largement comme il a été dit précédemment. Après quarante-huit heures, la réaction suivante est pratiquée, après vérification de l'abondance de la pousse.

On ajoute à chaque tube 0,1 cm³ d'une solution d'acide sulfanilique dans l'acide acétique (0,2 g pour 100 cm³ d'acide acétique à 30 p. 100 [5N]. Poids spécifique 1 041). Le mélange est soigneu-

(2) Nous avons respecté cette température pour raisons de standardisation, bien que la pousse du bacille pesteux soit moins rapide et abondante à 37° qu'à 32° C.

sement agité puis on ajoute goutte à goutte une solution d' α -naphtylamine dans l'acide acétique (0,5 g pour 100 cm³ d'acide acétique comme ci-dessus). Si la réaction est positive, une coloration allant du rose franc au rouge clair doit apparaître dans le tube, après adjonction de V gouttes au maximum.

Au cours de nos recherches nous avons utilisé constamment, dans chaque expérience, les souches suivantes : comme test de fermentation du rhamnose, une souche de *Past. Pseudotuberculosis* ; comme test de fermentation de la glycérine, une souche de staphylocoque doré et la souche de peste Tjiwidedj (Java) ; comme test de non-fermentation de la glycérine et du rhamnose, la souche de peste avirulente E. V. de Girard et Robic et une *Brucella abortus* ; comme test de production d'acide nitreux et de réduction des nitrates en nitrites, la souche de peste E. V. et la souche Tjiwidedj ; comme test de non-production d'acide nitreux et de non-réduction des nitrates en nitrites, une souche de *Brucella abortus*.

II. — RÉSULTATS.

Les 73 souches étudiées ont montré des caractères identiques : fermentation de la glycérine, pas de fermentation du rhamnose, pas de production d'acide nitreux, pas de réduction des nitrates en nitrites.

Nous donnons au tableau les résultats de l'étude de la fermentation de l'eau peptonée glycinée par ces souches, selon les indications de R. Pollitzer et bien qu'il nous semble que la question de la durée de l'apparition et du développement de la réaction n'ait qu'une valeur très relative, restant avant tout facteur de la richesse de l'ensemencement et surtout de la rapidité et de l'intensité de la pousse du microbe.

Cette durée se montre fréquemment différente d'un tube à l'autre dans une même expérience, ou dans deux expériences différentes et les chiffres que nous donnons sont les moyennes de plusieurs tubes et de plusieurs essais pour chaque souche.

III. — DISCUSSION.

Ces 73 souches isolées dans le foyer du Kurdistan montrent donc une remarquable fixité de caractère. Toutes fermentent la glycérine, ne fermentent pas le rhamnose, ne produisent pas d'acide nitreux et ne réduisent pas les nitrates en nitrites.

Or, jusqu'à présent, un tel ensemble de caractères n'a été reconnu qu'en un seul point du monde. C'est à l'Institut d'Etat de Microbiologie et d'Epidémiologie du Sud-Est de l'URSS, à Saratov, que S. Konovalova [5], étudiant les 146 souches de la collection de cet Institut, observait que 118 d'entre elles se mon-

TABLEAU.

SOUCHE	ORIGINE	LOCALITÉ	FERMENTATION de la glycérine				
			—	+	++	+++	++++
PKR 1. . .	Mérion.	Aghnolagh Morched.	1	2	3	2	13
PKR 2. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	5	3	1	3	9
PKR 3. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	5	3	2	7
PKR 4. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	2	4	3	4	8
PKR 5. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	3	3	4	2	9
PKR 6. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	3	2	3	9
PKR 7. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	6	3	3	5
PKR 8. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	2	4	2	9
PKR 9. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	5	2	1	3	10
PKR 13. . .	Mérion.	Djameh Chouran.	3	2	8	3	5
PKR 14. . .	Belette.	Sameleh.	4	5	2	3	7
PKR 15. . .	Mérion.	Sameleh.	4	3	5	4	5
PKR 16. . .	Mérion.	Sameleh.	2	3	4	5	7
PKR 17. . .	Gerboise.	Mahmoud Gazak.	4	3	4	5	5
PKR 18. . .	Mérion.	Sameleh.	3	3	2	7	6
PKR 19. . .	Mérion.	Gala Kan.	3	4	6	1	7
PKR 20. . .	Gerboise.	Haftachian.	2	2	3	2	12
PKR 21. . .	Mérion.	Satar	3	3	4	4	7
PKR 22. . .	Mérion.	Tchayabad.	4	3	5	2	7
PKR 23. . .	Mérion.	Tchameh.	4	3	2	5	7
PKR 24. . .	Mérion.	Tchameh.	3	3	6	4	5
PKR 25. . .	Puces.	Sanneh.	3	4	6	3	5
PKR 26. . .	Mérion.	Chater Abad.	4	3	6	2	6
PKR 27. . .	Mérion.	Mirabad.	5	4	3	3	6
PKR 28. . .	Mérion.	Natchid.	5	3	3	4	6
PKR 29. . .	Mérion.	Yekchabé.	3	3	4	3	8
PKR 30. . .	Mérion.	Yekchabé.	5	3	1	5	7
PKR 31. . .	Mérion.	Yekchabé.	4	3	5	1	8
PKR 32. . .	Mérion.	Kariz.	3	3	3	3	9
PKR 33. . .	Mérion.	Gol.	4	4	3	3	7
PKR 34. . .	Puces.	Gol.	3	3	2	4	9
PKR 35. . .	Mérion.	Kaltaké.	2	2	2	2	13
PKR 36. . .	Mérion.	Natchid.	3	3	5	5	5
PKR 37. . .	Mérion.	Mohammad KhaIadj.	1	1	4	3	12
PKR 38. . .	Mérion.	Mohammad Khaladj.	3	1	3	7	7
PKR 39. . .	Mérion.	Kenaderli.	2	2	3	4	10
PKR 40. . .	Ellobius.	Hey.	2	2	3	6	8
PKR 41. . .	Mérion.	Bizine.	3	2	5	3	8
PKR 42. . .	Mérion.	Bizine.	5	2	2	2	10
PKR 43. . .	Mérion.	Djachniabad.	5	3	4	4	5
PKR 44. . .	Mérion.	Assiab Djahanam.	2	3	5	3	8
PKR 45. . .	Gerboise.	Sou Darassi.	2	2	3	7	7
PKR 46. . .	Mérion.	Pochtang.	2	2	3	4	10
PKR 47. . .	Mérion.	Yekka Darassi.	2	2	2	2	13
PKR 48. . .	Mérion.	Haftachian.	1	2	2	5	11
PKR 49. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	2	2	5	4	8
PKR 50. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	1	2	3	2	13
PKR 51. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	3	5	4	3	6
PKR 52. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	2	2	4	4	9
PKR 53. . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	2	3	3	5	8

N. B. — Les signes —, +, ++, +++, +++++, indiquent les degrés de fermentation et de virage de l'indicateur. les chiffres dans les colonnes donnent la durée en jours de chaque phase de la fermentation.

SOUCHE	ORIGINE	LOCALITÉ	FERMENTATION de la glycérine				
			—	+	++	+++	++++
PKR 54 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	1	1	5	13	
PKR 55 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	2	4	5	3	6
PKR 56 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	3	3	2	3	11
PKR 58 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	6	3	1	2	9
PKR 59 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	6	4	3	2	6
PKR 60 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	2	1	1	13
PKR 61 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	7	3	1	2	8
PKR 62 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	5	2	1	3	10
PKR 63 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	6	4	2	1	8
PKR 64 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	3	3	2	2	11
PKR 65 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	7	1	1	2	9
PKR 66 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	8	1	1	2	9
PKR 67 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	3	2	2	3	11
PKR 68 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	1	1	3	12
PKR 69 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	3	2	1	11
PKR 70 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	4	3	1	2	11
PKR 71 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	6	3	2	2	8
PKR 72 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	1	3	1	2	6
PKR 74 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	6	2	1	1	11
PKR 75 . .	Mérion.	Aghbolagh Morched.	6	3	1	2	8
PKH 1 . .	Homme, peste pulmonaire.	Sar Baghaleh.	3	3	2	2	11
PKH 2 . .	Homme, peste pulmonaire.	Aghbolagh Morched.	2	2	2	6	9
PKH 3 . .	Homme peste pulmonaire.	Aghbolagh Morched.	3	3	3	7	6
PKH 4 . .	Homme, peste bubonique.	Mazidabad.	3	4	2	4	8

traient incapables de produire de l'acide nitreux et de transformer les nitrates en nitrites. Ces 118 souches provenaient toutes de la zone placée sous le contrôle épidémiologique de l'Institut de Saratov, c'est-à-dire la zone comprise entre la basse Volga et le fleuve Oural (Kazakistan de l'Ouest). Toutes avaient été isolées par les chercheurs de l'Institut de Saratov (certaines depuis 1907), de rongeurs ou de puces, de l'homme ou même du chameau, dans cette zone ; la plupart étaient des souches de spermophiles. En opposition, les autres souches de la collection fermentant ou ne fermentant pas la glycérine (souches de Mongolie, de Transbaïkalie, de l'Inde, d'Italie et par exception deux souches du Kazakistan), montraient dans le même temps et avec les mêmes techniques, le pouvoir de produire de l'acide nitreux, ou de réduire les nitrates en nitrites. Konovalova qui, avec l'équipe de la Section de la Peste de l'Institut de Saratov, était surtout orienté vers la différenciation du bacille pesteux et de *Past. Pseudotuberculosis* ne semble pas avoir tiré de conclusions particulières de ce comportement spécial des souches du Sud-Est de l'URSS.

C'est R. Devignat qui, dans son effort de reclassement des souches de bacilles pesteux d'après leurs caractères biochimiques, a attiré l'attention sur le travail de Konovalova. Dans un article récent : « Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse » [6], cet auteur, tenant compte de la rigueur des observations de Konovalova, sépare les souches du Sud-Est de l'URSS sous le nom de Variété III : *Pasteurella* (ou *Yersinia*) *pestis* var. *medievalis*. C'est en effet à cette variété que l'auteur attribue, d'après les données historiques, les grandes invasions de la peste noire au Moyen Âge.

Sans que nous ayons à prendre parti pour ou contre l'hypothèse, basée sur une solide étude historique, de Devignat, il faut reconnaître que les faits que nous apportons justifient au moins deux des vues de cet auteur. La première est l'ancienneté de cette variété : nous avons dit dans notre précédent travail [4] combien les conditions anciennes semblaient être restées intactes au Kurdistan, gardant à la peste sa figure originelle. La seconde est sa distribution géographique : Devignat écrit, à propos de sa variété III : « Peut-être s'étendrait-elle au pourtour de la mer Caspienne et même à l'Asie mineure » ; nous avons montré que ce foyer s'étendait de façon certaine à l'Irak et, selon toute vraisemblance, au Sud de la Turquie.

Mais les deux faits d'importance sur lesquels nous voudrions attirer l'attention sont les suivants. Le premier est que le foyer du Kurdistan et celui du Sud-Est de l'URSS, malgré la parenté biochimique de leurs souches, apparaissent géographiquement distincts. L'historique de la peste dans ces régions et nos propres recherches semblent pouvoir nous permettre d'affirmer que la peste enzootique n'existe pas en Azerbaïdjan. Le deuxième est que dans ces deux foyers, voisins mais distincts, les conditions de conservation de la peste paraissent identiques. Nous avons, pour notre part, montré que le foyer du Kurdistan est un foyer de peste pure du mérion (*Meriones persicus persicus*, *M. shawi tristrami*, *M. libycus erythroua*). Discutant le travail de Tikhomirova [7], nous avons par ailleurs montré combien les conclusions de cet auteur semblaient difficilement récusables : le foyer de peste du Sud-Est de l'URSS, d'où ont été isolées les 118 souches étudiées par Konovalova, semble bien, comme celui du Kurdistan, être un foyer de peste du mérion (*M. meridianus*, *M. tanaricinus*) ou tout au moins un foyer où le mérion est le conservateur et l'origine permanente de la peste des rongeurs.

Cette similitude des souches dans les deux seuls foyers de mérions actuellement connus dans le monde est-elle due simplement au voisinage géographique de ces foyers et à une origine peut-être commune ou à quelque autre facteur, tel que la résistance particulière de ce genre de rongeurs à la peste ? Il nous

semble de grand intérêt d'identifier les autres foyers de mérions qui peuvent exister dans le monde, et très probablement, par exemple, en Afrique du Nord, et d'étudier les caractères biochimiques des souches isolées des foyers invétérés de l'intérieur, tels ceux de Cyrénaïque, de Tunisie ou du Maroc par exemple.

RÉSUMÉ.

73 souches de peste, humaines ou animales, isolées dans le foyer du Kurdistan montrent toutes les mêmes caractères biochimiques : fermentation de la glycérine, pas de fermentation du rhamnose, pas de production d'acide nitreux, pas de réduction des nitrates en nitrites.

Ces caractères sont identiques à ceux des souches du foyer russe du Nord de la Caspienne, qui est également un foyer de peste « sauvage » du mérion. Ces deux foyers sont les seuls foyers de peste du mérion actuellement connus dans le monde, les seuls également où les souches isolées présentent ces caractères biochimiques particuliers.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BALTAZARD, M. BAHMANYAR, Ch. MOFIDI et B. SEYDIAN. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 1952, **5**, 441.
- [2] R. POLLITZER. *Note de documentation pour le Comité d'Experts de la Peste de l'OMS*, 1950.
- [3] R. H. CHEN. *J. infect. Dis.*, 1949, **85**, 97.
- [4] G. PETRAGNANI. *Bull. Office internat. Hyg. publ.*, 1937, **29**, 2522.
- [5] S. KONOVALOVA. *Rev. Microbiol., Epidémiol. et Parasitol.*, Saratov, 1930, **9**, 513.
- [6] R. DEVIGNAT. *Bull. Organisation Mondiale de la Santé*, 1951, **4**, 247.
- [7] M. M. TIKHOMIROVA. *Rev. de Microbiol., Epidémiol. et Parasitol.*, Saratov, 1934, **13**, 89.

A PROPOS DE LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE DE L'ANTISTREPTOKINASE

par A. BERTOYE et P. DETOLLE (*).

(Institut bactériologique de Lyon.)

Tillett et Garner en 1933, dans leur publication originelle sur la streptokinase (alors appelée fibrinolysine streptococcique), avaient déjà donné une méthode permettant d'avoir une indication approximative sur la quantité d'antistreptokinase contenue dans le plasma. Méthode de réalisation aisée puisque ne nécessitant, comme tout matériel, qu'un filtrat de culture de streptocoque fibrinolytique et du plasma humain. Mais cette méthode donne souvent des résultats difficiles à interpréter car elle fait intervenir dans des proportions indéterminées les différents facteurs de la fibrinolyse.

Le mécanisme de la fibrinolyse est en effet complexe, et peut se résumer par le schéma suivant :

Une substance contenue dans le sang, le *plasminogène*, est transformée sous l'effet d'activateurs en *plasmine*. Celle-ci possède des propriétés protéolytiques qui provoquent la lyse de la fibrine.

La streptokinase est un des activateurs du plasminogène, c'est pourquoi, lorsqu'on l'ajoute au plasma humain, il entraîne la lyse du caillot par l'intermédiaire de la plasmine.

D'autre part, il existe dans le sang des sujets normaux un système qui tend à s'opposer à cette action fibrinolytique.

L'*antistreptokinase*, qui est l'objet de cette étude, existe à un faible taux chez les sujets normaux ; à des taux très élevés chez des malades ayant certaines affections (maladie de Bouillaud).

Un *inhibiteur de la plasmine*, encore appelé inhibiteur trypsique, existe également dans le sang des sujets normaux, mais ne présente pas de grosses variations.

Les différentes méthodes proposées depuis Tillett (par Anderson, Christensen, Fergusson, Graffar, Kaplan) pour doser la quantité d'antistreptokinase nécessitent l'apport à l'état pur de fibrinogène, thrombine, plasminogène, streptokinase. Ces méthodes sont évidemment très intéressantes au point de vue scientifique, car elles éliminent les causes d'erreur. Malheureusement, cette précision entraîne par elle-même de grosses complications tech-

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 8 mai 1952.

niques, par l'utilisation de substances de conservation difficile et nécessitant toutes de fréquents dosages.

C'est pour éviter ces complications que nous avons utilisé une technique se rapprochant de celle de Tillet, mais qui élimine néanmoins la principale des causes d'erreur : le manque de plasminogène entraînant de « fausses réactions positives », manque de plasminogène qui existe normalement chez le nourrisson au cours de tuberculose ou de cachexie, et surtout lorsque le sang n'est pas utilisé immédiatement, dans les vingt-quatre premières heures au plus tard.

Cette technique se fait en deux temps :

Le premier temps utilise le plasma du sang à expertiser et apprécie l'activité du système fibrinolytique global.

Le deuxième temps utilise le sérum et apprécie plus électivement la quantité d'antistreptokinase.

Matériel : 1° Sang recueilli sur oxalate (10 cm³ de sang + 0,5 cm³ de solution à 10 p. 1 000). Centrifuger. Recueillir le plasma.

2° Chlorure de calcium : solution à 2,5 p. 1 000.

3° Eau physiologique à 8,5 p. 100.

4° Streptokinase : purification d'une culture de seize heures de streptocoque fibrinolytique (sélectionné par nos soins) par la précipitation par l'éthanol (Tillet), en utilisant, comme le montre Christensen, la concentration à 20 p. 100 à basse température. Obtention d'une poudre titrant 400 U au milligramme (comparativement à un échantillon de streptokinase Lederlé).

Conservation en ampoules sous vide à la glacière. Chaque ampoule contient 3 mg.

La solution de streptokinase se prépare extemporanément en mettant le contenu d'une ampoule dans 10 cm³ d'eau physiologique ; 0,03 à 0,04 cm³ de cette solution entraînent la lyse d'un caillot formé par 0,2 cm³ de plasma normal.

5° Tubes à hémolyse parfaitement propres. Pipettes au 1/100.

Premier temps. — On répartit une série de 8 tubes dans lesquels on met (pour chaque plasma) :

	1	2	3	4	5	6	7	8 (témoin)
Plasma oxalaté	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sérum physiologique	1	1	1	1	0,9	0,85	0,8	1
Solution de streptokinase	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,15	0,2	
Cl ₂ Ca à 2,5 p. 1 000	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45

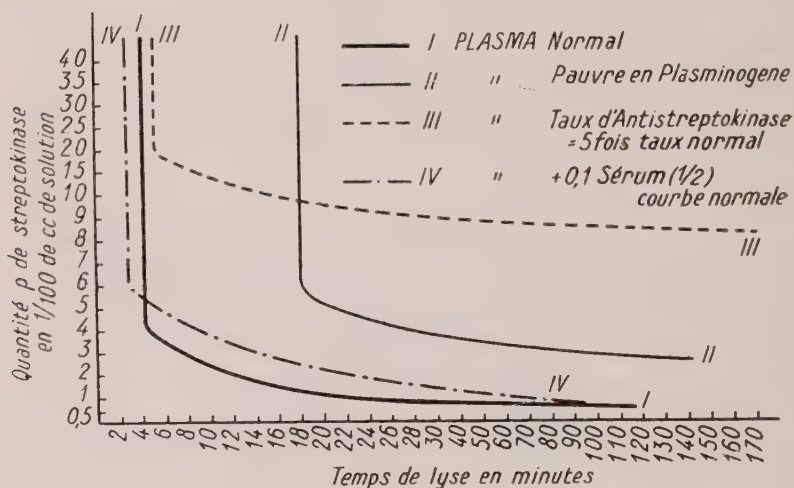
Les tubes sont agités, placés au bain-marie à 37°. On note les

temps nécessaires à la coagulation, puis à la lyse totale, marquée par la liquéfaction complète des caillots.

Pour un plasma normal on obtient les résultats suivants :

	1	2	3	4	5	6	7	8
Temps de lyse.	15 min.	4 min.	3 min.	3 min.	3 min.	3 min.	3 min.	24 h. ou plus.

Si l'on augmente encore les doses de streptokinase, on n'arrive pas à diminuer ce temps de lyse minimum qui, pour un sang



normal, varie entre trois minutes et sept minutes. Si on les diminue, par contre, on obtient des temps considérablement augmentés.

Si l'on construit la courbe des temps de lyse en fonction des quantités de streptokinase on obtient la figure ci-jointe (courbe n° I).

Le temps minimum (quatre minutes) nécessaire à la lyse correspond à l'activité maximum de la plasmine contenue dans le caillot. Dès que l'on a une quantité de streptokinase suffisante on ne peut accélérer la lyse par une dose supérieure (en admettant que l'on ait un taux de plasminogène normal) ; cette quantité minimum de streptokinase nécessaire est avant tout fonction du taux d'antistreptokinase.

Cette courbe nous fournit donc une double indication :

On agite, on porte au bain-marie à 37°, on note le temps de coagulation, puis le temps de lyse.

Si le sérum X est normal, on obtient les résultats suivants :

Temps de lyse, en min. 5 2,30 2,30 2,30 2,30 2,30 2,30 2,30 (courbe 4).

Le fait d'avoir ajouté 1 cm³ de sérum dilué a :

- 1° Diminué le temps minimum de lyse (par apport de plasmine) :
- 2° Augmenté de 0,02 cm³ la quantité minima de streptokinase nécessaire (par apport d'antistreptokinase).

Si le sérum X contient un taux d'antistreptokinase N fois supérieur au taux normal, il faudra augmenter (de 0,02 cm³ × N) la quantité minima de streptokinase.

(Si le fait d'ajouter du sérum retarde ou inhibe complètement la lyse du caillot plasmatique témoin, c'est que l'on est en présence d'un sérum contenant une antiplasmine).

Les résultats obtenus par ce deuxième temps sont, en général, assez concordants avec ceux obtenus au premier.

Résumé. — Méthode d'appréciation quantitative de l'antistreptokinase du sang par la mesure de la quantité minimum de streptokinase nécessaire pour obtenir l'activation totale du plasminogène.

Méthode simple en deux temps ne nécessitant comme matériel que des plasmas à étudier en série, du Cl₂Ca et de la streptokinase. Elle permet, cependant, d'éliminer la principale cause d'erreur : le manque de plasminogène, responsable du plus grand nombre des « fausses réactions positives ».

Cette technique, appliquée déjà par nous à un assez grand nombre de cas, permet d'obtenir d'utiles renseignements servant au diagnostic de la maladie de Bouillaud, en particulier. Cette étude fera l'objet d'un exposé ultérieur.

BIBLIOGRAPHIE

- W. S. TILLET et L. GARNER. *J. exp. Med.*, 1933, **58**, 485-562.
 BENEDICT, F. MASSEL, J. MOTE, DUCKETT. *J. Immunol.*, 1939, **39**, 45-48.
 L. R. CHRISTENSEN. *J. Infect. Dis.*, 1940, **66**, 278-284.
 HASKELL et MILTONE. *J. Immunol.*, 1941, **42**, 109-116.
 M. GRAFFAR. *Acta Biol. Belgica*, 1942, **2**, 433-437, 437-440.
 P. BOISVERT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1942, **49**, 678-680.
 H. J. TAGNON, C. S. DAVIDSON et F. H. L. TAYLOR. *J. Clin. Invest.*, 1942, **21**, 525-531.
 J. H. FERGUSSON. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1943, **52**, 243-245.
 L. R. CHRISTENSEN. *J. Gen. Physiol.*, 1945, **28**, 363-383.
 M. H. KAPLAN. *J. Clin. Invest.*, 1946, **25**, 337-346, 347-351, 352-359.
 J. H. FERGUSSON, B. L. TRAVES et E. B. CERHEIM. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **64**, 285-289.

- H. C. ANDERSON, H. G. KUNKEL et MAC CARLY. *J. Clin. Invest.*, 1948, **27**, 425-434.
- O. D. RATNOFF. *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 199-209, 211-218.
- J.-P. SOULIER. *Semaine des Hôpitaux Paris*, août 1948, 2021-2026.
- L. R. CHRISTENSEN. *J. Clin. Invest.*, 1949, **28**, 163-172.
- E. W. TODDT. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 295-308, 309-324.
- O. D. RATNOFF. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1949, **84**, 29-42.
- G. R. DOWNIE et E. E. CLIFFON. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **71**, 138-141.
- B. B. WELLS, H. N. MARVIN et M. WALDVOGEL. *Am. J. Clin. Path.*, 1949, **19**, 448-453.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 5 Juin 1952.

Présidence de M. GASTINEL.

COMMUNICATIONS

TEST DE NELSON ET TRÉPONÈMES TUÉS

par GASTINEL, P. COLLART et J.-L. BOREL (*).

(Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie.)

Nous avons montré avec Sausse dans une communication antérieure [1] qu'il était possible d'obtenir l'apparition d'anticorps immobilisant le Tréponème, en préparant des lapins par des injections endoveineuses répétées de Tréponèmes.

Nos premières recherches étaient faites au moment même où Ch. MacLeod et Magnusson [2] publiaient de leur côté les résultats d'expériences analogues faites chez la souris. Ils avaient eux aussi observé la positivité du test de Nelson chez des animaux inoculés avec des spirochètes tués par la chaleur ou par le mapharsen.

Depuis lors nous avons continué nos recherches et confirmons aujourd'hui nos premières constatations.

Le matériel inoculé fut préparé de la manière suivante :

Tantôt l'émulsion tréponémique de souche Nichols a été chauffée à 56° pendant une heure, trois fois de suite à vingt-quatre heures d'intervalle et ultérieurement formolée avec une solution à 1 p. 100 ; l'émulsion ainsi obtenue contenait environ 1 milliard et demi de germes par centimètre cube.

Tantôt les spirochètes de la même souche ont été détruits par contact durant quarante-huit heures avec une solution de formol à 1 p. 100. Ils étaient ensuite centrifugés pendant une heure à 8 000 tours deux fois de suite et chaque fois lavés au sérum physiologique à vingt-quatre heures d'intervalle. Le culot de centrifugation était ensuite repris dans

(*) Travail exécuté avec l'aide de l'Institut national d'Hygiène et la Caisse nationale de Sécurité sociale.

du sérum physiologique formolé à 1 p. 1 000. L'ensemble titrait environ 60×10^8 Tréponèmes par centimètre cube.

Les préparations ainsi obtenues étaient totalement avirulentes par inoculation intratesticulaire ou sous-scrotale. Ajoutons d'ailleurs que les injections intraveineuses aux animaux en expérience ne provoquaient absolument aucune manifestation.

Toutes les injections furent faites par voie veineuse à doses variant de 1/2 à 1 cm³ deux fois par semaine à 9 reprises.

Avant toute expérience les animaux n'avaient aucune immobilisine dans leur sérum.

Les résultats obtenus peuvent se schématiser ainsi : Entre le vingt et unième et le trente-quatrième jour après la dernière injection préparante, nous avons constaté l'apparition d'immobilisines dans le sérum donnant des réactions allant de 60 à 100 p. 100. Mais ces anticorps recherchés en série n'ont apparu que de façon éphémère. Nous avons assisté à leur rapide fléchissement tombant en un à deux mois à des taux de 17 et 22 p. 100.

Nous avons pu nous assurer que la positivité de la réaction ne s'accompagnait bien entendu d'aucune virulence des ganglions vérifiée par transfert. Nous savions aussi par des expériences antérieures que les lapins préparés avec des émulsions de Tréponèmes tués n'acquièrent de ce fait aucune immunité et que, si on les inocule, ils sont réceptifs à l'apport de virus syphilitique. Nous le confirmons à nouveau.

Ces nouvelles recherches que nous publions aujourd'hui corroborent celles faites tout récemment aussi par Magnusson et Mac Leod [3] en complément de leurs travaux antérieurs de 1951. Ces auteurs constatent comme nous chez le lapin l'apparition d'immobilisines à la suite d'injections de Tréponèmes tués faites par voie intrapéritonéale. Les animaux n'avaient acquis également aucune immunité.

Nous rapportons nos observations expérimentales en raison du débat ouvert sur la signification qu'il convient d'accorder au test d'immobilisation. Nous savions déjà, et M. Levaditi [4] l'a récemment rappelé que ce test peut être en rapport avec une infection présente virulente et active, ou bien qu'il peut persister même après celle-ci. En cela il est conforme à ce que nous connaissons d'autres réactions biologiques au cours des infections.

Mais voici que l'anticorps immobilisant est susceptible d'apparaître alors même que l'infection n'a pas existé et que l'antigène seul a été introduit avec le germe mort, sans entraîner l'état réfractaire de l'animal à une inoculation virulente.

Ce phénomène est analogue à l'apparition du pouvoir neutralisant du sérum d'un lapin préparé avec un virus jennérien tué, sans que soit modifiée la réceptivité de l'animal à l'inoculation ultérieure du virus vivant de la vaccine.

En conséquence, il ne semble donc pas que le test de Nelson puisse être considéré comme le témoignage de processus immunitaires.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] P. GASTINEL, P. COLLART et A. SAUSSE. *Bull. Soc. Fr. Dermat. Syphil.*, 1951, **58**, 551.

- [2] MAC LEOD et MAGNUSON. *J. vener. Dis. Inform.*, 1951, **32**, 274.
[3] Ch. MAC LEOD et MAGNUSON. Communication orale du Symposium de Washington, 1er-2 mai 1952.
[4] LEVADITI. *La Presse Médicale*, 20 octobre 1951, p. 1361.

LES IMMOBILISINES ANTI-RÉCURRENTIELLES (*BORRELIA DUTTONI*)

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN.

(Institut Alfred-Fournier. Service de M. LEVADITI.)

L'apparition d'anticorps spirillicides, spirillolytiques et opsonisants dans le sérum d'animaux ou d'humains contaminés par des spirilles récurrentiels, lors du déclenchement de la crise, a été démontrée par Sawtchenko [1], par C. Levaditi et Roché [2] et, plus récemment, grâce aux recherches entreprises par Constantinesco [3] à l'occasion d'épidémies de fièvre récurrente ayant sévi à Yassy (Roumanie) en 1946. Levaditi et Roché ont montré que les spirilles de la Tick-fever qui provoquent des rechutes chez le rat, deviennent anticorps-résistants, en ce sens qu'ils se révèlent réfractaires *in vitro* aux effets immobilisants, lytiques, agglutinants et opsonisants des anticorps sériques. Dès 1907, ces auteurs ont précisé le mécanisme de cette résistance acquise et montré qu'il s'agissait, en l'espèce, d'une sélection que les anticorps effectuent parmi une population de spirilles comportant des individus réceptifs et d'autres, plus rares, qui ne le sont pas. Ces derniers se multiplient lors des récidives : leur état réfractaire se transmet héréditairement à leur descendance (mécanisme où la génétique moderne joue un rôle essentiel). Pour la première fois, la notion de la sélection fut invoquée pour expliquer le mécanisme de cette résistance acquise (1).

Or, lorsque nous avons récemment confirmé [4] les résultats fournis par l'application de la méthode de Nelson et Mayer [5] (utilisée également par Magnusson et Thompson [6]) au séro-diagnostic de la syphilis (méthode basée sur l'immobilisation de *Treponema pallidum* en présence de sérums spécifiques), nous nous sommes demandé si des essais analogues, effectués avec des spirilles autres que ce tréponème, tels *Borrelia duttoni* ou le *Spirillum gallinarum*, se prêteraient à des investigations du même genre. Nous avons résolu ce problème et nous exposons dans la présente note les résultats acquis avec le *Borrelia duttoni*.

(1) Nous venons de confirmer ces résultats concernant la résistance aux immobilisines des spirochètes récurrentiels de récidive. Nous reviendrons prochainement sur ce sujet.

I. — IMMOBILISINES ANTI-RÉCURRENTIELLES.

Technique. — Nous avons examiné le pouvoir immobilisant du sérum le souris, de rats, de cobayes et d'un sujet humain contaminés avec le *Borrelia duttoni*, sérum prélevé à divers moments de l'évolution de leur spirillose. L'examen a été fait en présence et en l'absence de complément de cobaye. L'effet du pouvoir immobilisant de ces sérums a été testé soit sur des spirilles cultivés *in vitro* dans le milieu de Mesnil, soit sur des parasites présents en grand nombre dans le sang de souris infectées. La méthode utilisée fut celle de Nelson (milieu du même auteur). L'intensité de l'immobilisation a été évaluée en pourcentage des parasites ayant cessé de se mouvoir (observation après dix-huit heures de séjour à 37°).

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-contre.

I. *Souris.* — 18 souris, préalablement contaminées, ont fourni les sérums à tester. Le sang a été prélevé à des intervalles divers entre le dix-septième et le cent soixante-dixième jour après l'infection. 5 souris normales ont fourni des sérums témoins.

Il découle des données résumées dans ce tableau ce qui suit :

a) Les immobilisines, dont le taux oscille, chez les sujets témoins, entre 5 et 20 p. 100, augmentent en intensité dès le dix-septième jour (50 p. 100), pour atteindre 100 p. 100 et se maintenir à cette valeur jusqu'au cent cinquante-septième jour. Une atténuation nette apparaît vers le cent soixante-dixième jour. Cela en présence de complément et à l'égard de spirilles cultivés dans le milieu de Mesnil. En l'absence de complément, le taux des principes immobilisants est tant soit peu inférieur au précédent.

b) Cinq titrages ont été effectués en présence de spirilles contenus dans le sang de souris infectées. Le taux des immobilisines a atteint 70 à 100 p. 100, en présence ou en l'absence de complément.

CONCLUSION. — Au cours de l'évolution de la spirillose provoquée chez la souris par le « *Borrelia duttoni* », des immobilisines anti-spirillaires (peu importe s'il s'agit de parasites cultivés *in vitro*, ou de spirilles contenus dans le sang des souris) apparaissent dans le sérum. Leur taux augmente progressivement pendant cette évolution, pour diminuer sensiblement à une période tardive de la maladie.

Deux points méritent d'attirer l'attention. D'abord, le fait que l'activité anti-spirillaire des anticorps ne se borne pas exclusivement à une immobilisation des germes, mais provoque également une lyse rapide d'un nombre variable de ces germes, ainsi qu'il est prouvé par un appauvrissement sensible du milieu en *Borrelia*. Ensuite, cet autre fait, non moins important, à savoir : que la présence d'immobilisines dans le sérum n'exclut pas la persistance du virus pendant la période tardive de la spirillose. On sait, en effet, que ce virus se conserve dans le cerveau au cours de cette période, puisque le transfert d'un tel cerveau à des souris neuves leur confère la parasitose. Cette constatation est à rapprocher du processus qui caractérise la paralysie générale, où la présence du *Treponema pallidum* dans l'encéphale coïncide avec celle de taux élevés d'immobilisines sériques. Celles-ci ne sont donc pas toujours un indicatif de la stérilisation.

II. *Rats.* — Peu importe s'il s'agit de *Borrelia duttoni* cultivés, ou

TABLEAU.

SÉRUM DE SOURIS INFECTÉES depuis :	SPIROCHÈTES DE CULTURE (au moins 3 ^e passage)		SPIROCHÈTES (sang de souris)	
	avec complément p. 100	sans complément p. 100	avec complément p. 100	sans complément p. 100
<i>Souris.</i>				
17 jours	50	35		
17 —	50	50		
18 —	80	80	80	70
18 —	100	80		
21 —	100	100	100	100
37 —	100	70	100	80
39 —	100	80		
40 —	100	100		
40 —	100	70		
53 —	100	80	100	100
80 —	100	80	80	80
157 —	100	80		
160 —	80	50		
164 —	60	50		
164 —	80	50		
170 —	50	50		
170 —	50	50		
170 —	50	30		
Témoins souris normales.	20	15		
	10	10		
	20	20		
	5	5		
	10	5		
<i>Rats.</i>				
14 jours	80	50		
14 —	100	50	100	70
26 —	100	80	100	80
26 —	100	100	100	100
26 —	100	70		
26 —	100	80		
32 —	100	80	80	70
32 —	100	100		
32 —	80	80		
32 —	100	80		
60 —	80	70	80	50
<i>Cobayes.</i>				
43 jours	50	40	60	50
43 —	80	70	70	70
43 —	80	60	80	50
43 —	80	50	80	50
43 —	80	50	70	40
<i>Homme.</i>				
Avant l'infection	10	5	5	5
Au 17 ^e jour	80	80	100	80

de parasites présents dans le sang des sujets contaminés, le résultat est le même : apparition d'immobilisines vers le quatorzième jour et leur persistance, à des taux variant entre 50 et 100 p. 100, jusqu'au soixantième jour, date extrême de nos essais, et cela en présence ou en l'absence de complément.

III. *Cobayes*. — Résultats comparables aux précédents.

IV. *Homme*. — Un paralytique général, du Service de M. le Prof. Delay (Sainte-Anne) a été traité par M. Denicker, en lui inoculant des spirilles récurrentiels (même souche *duttoni*). Or, le taux des immobilisines anti-*Borrelia*, qui était de 5 à 10 p. 100 avant l'inoculation infectante, est monté à 80 et 100 p. 100 dix-sept jours après (test anti-tréponémique de Nelson : positif).

II. — ULTRACENTRIFUGATION.

Vaisman et Hamelin [7] ont séparé, au moyen de l'ultracentrifugation à 80 000 t/m, les « réagines » des « immobilisines » tréponémiques dans les sérums syphilitiques. Ils ont montré que « l'ultracentrifugation d'un sérum positif élimine en grande partie, voire même totalement les réagines syphilitiques ; au contraire, le pourcentage des immobilisines antitreponémiques reste inchangé ».

Nous avons entrepris des essais analogues avec les immobilisines récurrentielles en nous servant du sérum de 4 rats contaminés depuis trente-deux jours. Même technique. Lecture après dix-huit heures de séjour à 37°.

	POURCENTAGE d'immobilisation
Sérum non centrifugé	100
Sérum centrifugé 5 heures	100
Sérum centrifugé 8 heures	100
Sérum centrifugé 12 heures	100
Sérum centrifugé 15 heures	100
Sérum centrifugé 18 heures	76
Sérum centrifugé 24 heures	48
Suspension de spirochètes témoins	10

Ces données prouvent que les immobilisines récurrentielles persistent au taux de 100 p. 100 dans le sérum pendant quinze heures d'ultracentrifugation. Un léger fléchissement de ce taux n'a été observé qu'à partir de la dix-huitième heure (76 à 48 p. 100).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. — Des immobilisines spécifiques capables d'agir sur *Borrelia duttoni* ont été décelées dans le sérum de souris, de rats, de cobayes et d'un paralytique général, au cours de l'évolution de la spirillose provoquée par ce parasite. Elles y ont persisté pendant une longue période de temps, leurs effets étant à la fois immobilisants et lytiques. La présence de ces principes dans le sérum sanguin est compatible avec l'existence du virus récurrentiel dans l'encéphale des souris. L'ultracentrifugation, qui sédimente les « réagines » syphilitiques, ne paraît exercer qu'une influence légère sur les immobilisines récurrentielles qui, de ce point de vue, paraissent se comporter comme les immobilisines anti-tréponémiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SAWTCHENKO. *Ces Annales*, 1902, **16**, 106.
- [2] C. LEVADITI et ROCHÉ. *C. R. Soc. de Biol.*, 1907, **62**, 619 et 815.
- [3] BAILLIEF, CONSTANTINESCO et CHELARESCO. *Bull. Acad. Méd. Roumanie*, 1946, séance du 7 juillet.
- [4] C. LEVADITI. *La Presse Médicale*, 1951, n° 66, 1361. — VAISMAN et HAMELIN. *Ibid.*, 1951, n° 68, 1418.
- [5] NELSON et MAYER. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 369. — NELSON, DIESENDRUCK et ZHEUTLIN. *Curr. Progr. Study vener. Dis.*, 1949 (Publ. Health Service, Fed. Sec. Agency).
- [6] MAGNUSSON et THOMPSON. *J. Inf. Dis.*, 1949, **30**, 309.
- [7] VAISMAN et HAMELIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 156.

LES IMMOBILISINES ACTIVES A L'ÉGARD DU *SPIROCHAETA GALLINARUM*

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN:

(*Institut Alfred-Fournier, Service de M. LEVADITI.*)

Parallèlement à nos recherches concernant les immobilisines anti-récurrentielles [1], nous en avons entrepris d'autres se rapportant aux immobilisines agissant sur le *Spirochaeta gallinarum* (Marchoux et Salimbeni). Nous résumons dans la présente note les résultats enregistrés avec ce spirille.

Technique. — Spirilles cultivés dans le milieu de Marchoux et Chorine et mêmes spirilles contenus dans le sang de poules contaminées au préalable. Sérum de poules prélevé à des moments divers après la guérison de la maladie. Test en présence ou en l'absence de complément (sérum frais de cobaye). Milieu de Nelson, ou solution de Tyrode. Temps de séjour à 37° : trois heures. Pour le reste, même technique que celle dont on se sert dans les essais se référant aux immobilisines anti-tréponémiques présentes dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien des syphilitiques.

I. — IMMOBILISINES.

Les données condensées dans le tableau I permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° Les immobilisines anti-*Sp. gallinarum*, absentes dans le sérum de poules normales, apparaissent dans le sérum des poules contaminées dès le cinquième jour après l'infection (40 à 50 p. 100) ; leur taux atteint 100 p. 100 à partir du sixième jour. Elles persistent à ce dernier taux jusqu'au soixante et unième jour, date extrême de nos observations ;

2° La présence ou l'absence de complément n'influence guère la positivité de la réaction immobilisante ;

TABLEAU I.

SÉRUM DE POULE INFECTÉE depuis :	SPIROCHÈTES de culture		SPIROCHÈTES de sang de poule	
	en présence de complément	sans complément	en présence de complément	sans complément
5 jours	50 p. 100	50 p. 100	40 p. 100	40 p. 100
6 —	100 —	100 —	100 —	100 —
6 —	100 —	100 —		
13 —	100 —	100 —	100 —	100 —
13 —	100 —	100 —		
16 —	100 —	100 —		
16 —	100 —	100 —		
22 —	Lyse.	Lyse.	Lyse.	Lyse.
22 —	Lyse.	Lyse.	Lyse.	Lyse.
25 —	Lyse.	Lyse.		
45 —	100 p. 100	100 p. 100		
61 —	100 —	100 —		
Témoin, sérum de poule normale	0 —	0 —	0 p. 100	0 p. 100

3^e Un phénomène de lyse spirochétienne se déclenche entre le vingt-deuxième et le vingt-cinquième jour en présence de sérum de poules guéries. Cette lyse est presque instantanée ; certains spirilles ayant résisté, quoique partiellement altérés, conservent cependant la faculté de se mouvoir.

CONCLUSION. — La crise spirillaire chez les poules contaminées avec le *Spirochaeta gallinarum* déclenche l'apparition d'anticorps sériques immobilisants, lesquels persistent au moins pendant soixante et un jours après l'inoculation infectante. Le complément ne modifie pas l'allure du phénomène. Une lyse plus ou moins intense des éléments spirillaires peut s'ajouter à l'immobilisation de ces éléments.

II. — ULTRACENTRIFUGATION.

Nous avons étudié, par ailleurs, l'effet exercé par l'ultracentrifugation sur la teneur en immobilisines du sérum de poules ayant fourni une réaction de Nelson positive. La technique utilisée fut la même que celle employée par Vaisman et Hamelin [2] (*Treponema pallidum*) et par C. Levaditi, Vaisman et Hamelin [3] (*Borrelia duttoni*). Ultracentrifugation à 80 000 t/m à des temps divers. Examen du liquide surnageant et du dépôt de la centrifugation repris par de l'eau physiologique.

Ce tableau montre qu'avant d'être ultracentrifugé, le sérum d'une poule guérie était nettement lysant. Après quatre heures de centrifugation, le taux des immobilisines sériques a été de 80 p. 100 pour descendre vers 50 p. 100 entre douze et vingt-quatre heures. Cependant

TABLEAU II. — **Expérience avec le sérum d'une poule infectée depuis vingt-deux jours.**

TEMPS D'ULTRACENTRIFUGATION	SPIROCHÈTES de culture	SPIROCHÈTES de sang de poule
Liquide surnageant :		
0 heure	Lyse.	Lyse.
4 heures	80 p. 100	100 p. 100
8 heures	80 —	100 —
12 heures	50 —	80 —
18 heures	50 —	50 —
24 heures	50 —	50 —
Culot de centrifugation :		
4 heures	Lyse.	Lyse.
8 heures	Lyse.	Lyse.
12 heures	Lyse.	Lyse.
18 heures	Lyse.	Lyse.
24 heures	Lyse.	Lyse.
Témoïn sérum de poule normale.	0 p. 100	0 p. 100

des effets lysants du même sérum ont été retrouvés dans les dépôts de sédimentation.

CONCLUSION. — L'ultracentrifugation à 80 000 t/m ne débarrasse pas des immobilisines anti-*Spi. gallinarum*, le sérum qui les contient. Une certaine sédimentation de ces principes apparaît, cependant, à partir de la douzième heure. Des lysines anti-spirochétiennes ont été retrouvées dans le dépôt. Les immobilisines semblent donc se comporter, à peu d'écart près, comme les immobilisines anti-*Treponema pallidum* et antirécurrentielles, en ce sens qu'elles ne sédimentent guère (par suite de l'intervention de la force centrifuge) comme le font les « réagines » anti-tréponémiques.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. — *Des immobilisines anti-Spirochaeta gallinarum apparaissent dans le sérum des poules guéries, le phénomène d'immobilisation des spirochètes s'accompagnant d'une lyse partielle de ces parasites. Du point de vue des effets de l'ultracentrifugation, les immobilisines paraissent se comporter comme celles qui agissent sur le Treponema pallidum et le Borrelia duttoni.*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI, VAISMAN et HAMELIN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 256.
- [2] VAISMAN et HAMELIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 156.
- [3] C. LEVADITI, VAISMAN et HAMELIN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 256.

**LE *TREPONEMA PALLIDUM*
DÉVITALISÉ PAR LE RAYONNEMENT ULTRA-VIOLET
EST-IL UN ANTIGÈNE IMMOBILISANT ?**

par A. VAISMAN, A. HAMELIN et C. LEVADITI.

(Institut Alfred-Fournier. Service de M. LEVADITI.)

Nous avons montré récemment [1, 2] que les lapins inoculés par voies intraveineuse ou intravasculaire avec des *Treponema pallidum* dévitalisés par la chaleur ou par le formol, continuent à être réceptifs à l'égard d'un transfert tréponémique d'épreuve et n'élaborent nulle trace d'immobilisine dans leur sérum. Ces immobilisines ne font leur apparition que cinquante-neuf et soixante-trois jours au moins après l'épreuve de la résistance acquise, laquelle, d'ailleurs, est nulle. Les tréponèmes dévitalisés cessent donc d'être des antigènes générateurs de principes immobilisants. En est-il de même des spirochètes ayant perdu leur vitalité par suite de l'action stérilisante des rayonnements ultra-violet ? Nous examinons ce problème dans la présente communication.

Technique. — Une suspension de *Treponema pallidum* (syphilomes souche Nichols) dans le liquide de Tyrode est centrifugée pendant cinq minutes à 2 000 t/m (clarification). 10 cm³ de cette suspension sont versés dans des boîtes de Petri (diam., 10 cm). Irradiation au moyen d'une lampe Mazda ; longueur du tube : 30 cm ; distance : 52 cm ; puissance : 30 ergs/mm²/seconde. Cette irradiation a été effectuée par les soins de M. Latarjet, auquel nous adressons nos plus vifs remerciements. L'effet dévitalisant du rayonnement ultra-violet a été précisé dans notre laboratoire.

Nous avons examiné :

1° L'intensité de l'action dévitalisante du rayonnement U. V. après une exposition de cinq, dix et trente minutes, au moyen de l'examen de la mobilité des tréponèmes, des effets de leur transfert intratesticulaire à des lapins et de la virulence des ganglions poplités de ces lapins, évaluée cent neuf jours après ce transfert.

2° Le pouvoir immunisant des spirochètes irradiés et l'apparition des immobilisines sériques, titrée selon la méthode de Nelson et Mayer.

Le tableau I résume les résultats des essais se rapportant au premier point.

Il résulte des données condensées dans le tableau I que la dose de 18 000 ergs/mm² (exposition pendant dix minutes) supprime le pouvoir chancrigène du *Treponema pallidum* et sa généralisation dans le système lymphatique poplité, tout en respectant sa mobilité. C'est un des exemples de cette dissociation entre le pouvoir pathogène, d'une part, la mobilité des parasites, de l'autre. Une exposition pendant

TABLEAU I. — Effet tréponémicide du rayonnement U. V.

RAYONNEMENT U. V.	MOBILITÉ des tréponèmes	VIRULENCE POUR LE LAPIN		
		Numéro des lapins	Résultat de l'inoculation intratesticulaire	Tranfert des ganglions poplités au 109 ^e jour après l'épreuve
Durée : 30 minutes soit 54 000 ergs/mm ² .	Immobilés.	6	0	0
		7	0	0
		8	0	0
		9	0	0
Durée : 10 minutes soit 18 000 ergs/mm ² .	Mobiles.	10	0	0
		11	0	0
		12	0	0
Durée : 5 minutes soit 9 000 ergs/mm ² .	Mobiles.	14	Orchite au 40 ^e jour.	
		15	<i>Id.</i>	
		16	<i>Id.</i>	
		17	<i>Id.</i>	
Témoin.	Mobiles.	18	Orchite au 17 ^e jour.	
		19	<i>Id.</i>	
		20	<i>Id.</i>	
		21	<i>Id.</i>	

trente minutes (dose de rayonnement : 54 000 ergs/mm²) se comporte de même. Par contre, irradiés pendant cinq minutes (durée de rayonnement : 9 000 ergs/mm²), les spirochètes conservent leur mobilité et leur pouvoir chancrigène ; ils se comportent donc comme les parasites témoins, non irradiés.

Le tableau II se réfère au deuxième point :

Les lapins utilisés dans cette seconde série d'essais ont reçu, par injection intramusculaire, 6 cm³ de suspension tréponémique irradiée aux doses indiquées dans ce tableau (soit trente minutes et 54 000 ergs, vingt minutes et 36 000 ergs et dix minutes et 18 000 ergs) à trois reprises différentes (le premier, le septième et le quatorzième jour). Examen de la virulence des ganglions poplités le cinquante et unième jour et test des immobilisines sériques le quatre-vingt-septième jour. L'épreuve de la réceptivité à l'égard des spirochètes virulents a été effectuée le quatre-vingt-dix-huitième jour et le test de Nelson le trente-huitième jour après cette inoculation d'épreuve.

Le tableau II montre que la virulence du système lymphatique a été nulle cinquante et un jours après la première inoculation vaccinnante et que le test de Nelson s'est révélé totalement négatif chez tous les lapins utilisés. La réceptivité vis-à-vis de tréponèmes virulents s'est montrée normale (apparition de syphilomes testiculaires le quinzième

TABLEAU II. — Pouvoir vaccinant des tréponèmes irradiés et test de Nelson.

RAYONNEMENT U. V.	NUMÉRO des lapins	RÉSULTATS		ÉPREUVE PAR INJECTION de tréponèmes virulents le 98 ^e jour	
		Virulence des ganglions poplités le 51 ^e jour	Test de Nelson le 87 ^e jour	Apparition de chancres	Test de Nelson le 38 ^e jour p. 100
30 minutes, 54 000 ergs/mm ² .	6	0	Négatif.	15 ^e jour	78
	7	0	Négatif.	<i>Id.</i>	60
	9	0	Négatif.	<i>Id.</i>	62
20 minutes, 36 000 ergs/mm ² .	80	0	Négatif.	15 ^e jour.	57
	81	0	Négatif.	<i>Id.</i>	100
	82	0	Négatif.	<i>Id.</i>	47
	83	0	Négatif.	<i>Id.</i>	66
10 minutes, 18 000 ergs/mm ² .	10	0	Négatif.	15 ^e jour.	74
	11	0	Négatif.	<i>Id.</i>	74
	12	0	Négatif.	<i>Id.</i>	70

jour). Quand au test de Nelson, il devient positif trente-huit jours après l'épreuve de réceptivité, le taux d'immobilisation variant entre 47 et 100 p. 100 (moyenne 79 p. 100).

CONCLUSION. — Le *Treponema pallidum* dévitalisé par l'exposition aux rayonnements ultra-violets ne confère au lapin aucun état réfractaire et ne déclenche ni la contamination lymphatique, ni l'apparition d'immobilisines dans le sérum sanguin. Ce sérum ne devient immobilisant qu'après l'apparition des syphilomes testiculaires, lors de l'épreuve de réceptivité. Une dissociation se manifeste entre la perte de l'activité chancrigène et la mobilité des parasites, lesquels peuvent continuer à se mouvoir, alors qu'ils ont perdu leur pouvoir contaminant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. VAISMAN, A. HAMELIN et C. LEVADITI. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, séance du 10 mai (sous presse).
 [2] A. HAMELIN, A. VAISMAN et C. LEVADITI. *Ibid.*, même séance.

RECHERCHES SUR LE TYPE RESPIRATOIRE DE *VIBRIO FÆTUS*

par R. VINZENT, A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT.

(Laboratoire des Hospices Civils du Havre et Service des Anaérobies,
Institut Pasteur de Paris.)

Comme l'ont observé R. Vinzent et A. Alloy dans un travail récent [1] il est souvent difficile de cultiver *V. fætus* à la surface de la gélose inclinée et dans les bouillons aérés à cause du rH élevé de ceux-ci ; par contre, ces auteurs ont observé que la gélose profonde désaérée est un excellent milieu où chaque souche trouve d'emblée le niveau de rH qui lui convient, celui-ci étant différent pour chacune.

Dans ces conditions, il était intéressant de déterminer le type respiratoire de *V. fætus*, considéré généralement jusqu'ici comme un aérobie. La technique suivie est celle de A.-R. Prévot [2]¹ : gélose profonde VF glucosée à 2 p. 1 000, répartie en tubes calibrés de 8 mm de diamètre intérieur ; mesure du rH suivant le gradient déterminé par cet auteur au moyen des indicateurs colorés de rH.

Neuf souches ont été étudiées, provenant de la Collection de l'Institut Pasteur (1).

Sur ces 9 souches, 3 se sont comportées en gélose profonde comme des aérobies stricts : croissance exclusive dans les 3 mm supérieurs, soit d'après le gradient de Prévot entre rH = 20 et rH = 17.

Cinq autres se sont comportées comme des micro-aérophiles ayant leur croissance maximum autour de rH = 18 mais pouvant croître faiblement et uniformément jusque dans la profondeur de la gélose, soit jusque rH = 7,2-7,4. Sur les 5 micro-aérophiles, 3 pouvaient croître jusqu'à rH = 18,5 et 2 autres ne dépassaient pas rH = 18.

Une enfin se comportait comme un anaérobie strict du type IV de Prévot, c'est-à-dire présentait une culture exclusive en disque suspendu entre rH = 15 et rH = 17.

Si l'on ensemence en série cette souche de gélose profonde à gélose profonde, la croissance finit par s'étendre à toute la profondeur du tube. Ce comportement a été signalé jadis par Prévot pour *Neisseria discoides* et paraît être un phénomène général (du type mutation spontanée). Si au contraire on l'ensemence en gélose profonde additionnée d'ascite fraîche la croissance envahit la zone aérobie, ce qui s'explique par la modification de rH que cette addition fait subir au milieu.

Discussion. — Le type respiratoire de *V. fætus* étudié en gélose profonde VF glucosée se montre variable suivant les souches, mais dans la majorité des cas est du type anaérobie : 5 micro-aérophiles et 1 anaérobie strict, soit 6 souches anaérobies contre 3 aérobies.

(1) Entretienues par L. Segond que nous remercions vivement de nous avoir préparé les cultures en gélose-gélatine de ces 9 souches.

On a donc intérêt à utiliser ce milieu pour l'isolement, la culture et l'étude de cette espèce.

Le fait que parmi ces 9 souches, l'une s'est comportée comme un anaérobie strict nous incite à reconsidérer le travail de Curtis [3] qui, en 1913, a décrit un vibron anaérobie strict isolé des lochies d'une femme dans un cas d'infection puerpérale et dans les leucorrhées d'une autre femme dans un cas d'avortement. Ce vibron a été nommé par Prévot [4] *Vibrio mulieris* et classé dans le groupe des vibriens anaérobies non gazogènes.

Les caractères culturels ne diffèrent pas essentiellement de ceux de *V. fetus*. Le fait que sa présence a été constatée dans des cas d'avortement ou de fièvre puerpérale chez la femme pouvait faire penser qu'il s'agissait soit de la variété anaérobie de *V. fetus*, soit d'une espèce anaérobie stricte très voisine.

Récemment, un Américain, B. Q. Ward [5], s'est posé la même question. Cet auteur a eu l'occasion d'observer un cas bénin d'infection humaine à *V. fetus* : un travailleur mâle de son laboratoire, manipulant depuis des semaines des cultures du vibron, présenta une pustule à la joue ; dans le pus prélevé, coexistaient un bacille Gram-positif et un vibron qui fut identifié à *V. fetus*. « Ce fait montre », dit B. Q. Ward, « que ce vibron est capable de se greffer sur l'organisme humain. » Il ajoute : « A notre connaissance (2), un seul cas d'infection humaine se rapporte à ce microorganisme ou tout au moins à un microorganisme voisin, celui de Curtis. »

Reprenant la description de Curtis, nous avons cependant relevé quelques différences entre son vibron (*V. mulieris*) et *V. fetus*. Du point de vue de la morphologie, *V. mulieris* paraît être plus grand et plus gros. Il possède plusieurs cils qui s'insèrent électivement dans sa concavité, tandis que *V. fetus* n'en possède qu'un à chaque extrémité. Les cultures de *V. mulieris* dégagent une odeur désagréable, alors que celles de *V. fetus* en sont dépourvues. En outre, bien qu'il s'agit d'infection puerpérale et qu'une hémoculture ait dû être faite, il n'y est fait aucune allusion, cependant qu'une infection à *V. fetus* eût certainement donné une hémoculture positive.

Enfin, *V. mulieris* était associé à une flore polymicrobienne fréquemment rencontrée au cours d'affections variées de la sphère génitale de la femme. Toutes ces remarques nous conduisent à penser que *V. mulieris* est un hôte fréquent de la cavité vaginale, très différent de *V. fetus*.

CONCLUSIONS. — 1° *Vibrio fetus* ne présente pas un type respiratoire uniforme ;

2° Sur 9 souches, 6 se présentent comme des anaérobies dont 5 comme

(2) La communication de B. Q. Ward a été remise pour publication le 3 octobre 1947. Or, l'un de nous avec J. Dumas et N. Picard [6] avait publié, le 4 février de la même année, la première observation d'infection placentaire humaine provoquée par *V. fetus*. On sait qu'en 1949, le même auteur [7] en publia deux autres cas. Pour être complets, nous devons ajouter que, depuis, *V. fetus* a été obtenu en hémoculture à deux reprises, une fois chez une femme non gestante et une autre fois chez un homme (observations encore inédites).

des microaérophiles et 1 comme un anaérobie strict du type IV de Prévot ;

3° La gélose profonde désaérée et le bouillon faiblement gélifié sont des milieux de choix pour son isolement et sa culture ;

4° Malgré son type respiratoire, il semble bien devoir être distingué de *V. mulieris* (Curtis), p. 1940.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. VINZENT et A. ALLOY. (Sous presse.)
- [2] A.-R. PRÉVOT. *Bull. Soc. Phil. Paris*, 1938, **421**, 80.
- [3] A. H. CURTIS. *J. inf. Dis.*, 1913, **42**, 165.
- [4] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édition, 1948, 122.
- [5] B. Q. WARD. *J. Bact.*, 1948, **55**, 113.
- [6] R. VINZENT, J. DUMAS et N. PICARD. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1947, **431**, 90.
- [7] R. VINZENT. *La Presse Médicale*, 1949, **57**, 1230.

NOUVELLE APPLICATION DE L'USAGE DES CORPS TENSIO-ACTIFS EN PHYSIOLOGIE BACTÉRIENNE. COLORATION A FROID DES BACILLES TUBERCULEUX

par J. DESBORDES, Et. FOURNIER et Ch. GUYOTJEANNIN.

(Hôpital Bichat, Service du Dr J. PARAF.)

Nous avons déjà insisté sur une propriété de diverses substances tensio-actives vis-à-vis des germes A. A. R. rendant labile, dans certaines conditions, cette qualité tinctoriale [2, 3, 5].

Les résultats déjà obtenus montrent à la fois l'extrême résistance de l'enduit lipidique du corps bacillaire (très forte pour le bacille de Koch virulent, plus faible pour les germes A. A. R. para-tuberculeux) et la possibilité de faire disparaître l'A. A. R. grâce à l'emploi de certains détergents judicieusement choisis (mélange industriel concentré de lauryl-sulfate de soude et de dodécylbenzène sulfonate de soude, produits définis dans la nomenclature Sisley, tels que l'Igepal ou l'Ultron, par exemple).

Poursuivant nos recherches, nous avons observé que le contact des bacilles A. A. R. avec ces mêmes substances, au cours de la manipulation selon la méthode de Ziehl, permet de réaliser une telle coloration sans le concours de la chaleur, c'est-à-dire à la température du laboratoire.

De tels résultats rejoignent les essais tentés dès 1944, 1945 et 1950 par quelques auteurs qui proposèrent l'utilisation de diverses substances pour permettre une « imprégnation » plus facile des parois

cellulaires par les colorants : tels Randolph et Neekel [6] qui proposèrent pour le B. K. le propylène-glycol, Chermock et Muller [4] pour les techniques histologiques le tergitol, enfin Aubert [1] pour les germes A. A. R. le Tween 80.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Nos essais nous ont montré qu'il fallait utiliser une solution de fuchsine basique un peu plus concentrée que celles des techniques classiques (4 g pour 300 cm³) et ne pas trop insister sur les temps de décoloration (une minute pour l'acide dilué et une minute pour l'alcool à 90°). Dans ces conditions, le temps de contact des germes avec la fuchsine peut être ramené à trois minutes seulement (ce temps doit être assez exactement observé, un contact trop long étant nuisible). Il faut également que le détergent soit suffisamment dilué dans la fuchsine.

Nous avons effectué des essais avec des germes de collection et des produits pathologiques bacillifères. Voici nos résultats :

1° En opérant à froid, dans nos conditions expérimentales avec des germes de collection, et en utilisant une solution de fuchsine sans corps tensio-actifs, on observe que les bacilles A. A. R. sont colorés en bleu dans la proportion de 80 p. 100. On note la présence de 15 à 20 p. 100 de germes colorés *en rouge plus ou moins pâle*, on ne voit pas ou l'on voit mal les granulations.

2° En remplaçant la solution de fuchsine pure par un mélange de fuchsine-corps tensio-actif, la proportion précédente est inversée : on observe environ 10 p. 100 de germes cyanophiles et 90 p. 100 de germes fortement colorés *en rouge très vif*, les granulations étant très visibles.

3° Avec les produits pathologiques, les bacilles A. A. R. sont bien nets, colorés en rouge vif, brillants, les granulations apparaissent nettement (fuchsine tensio-active).

4° Les germes non A. A. R. ne sont pas colorés en rouge, mais sont cyanophiles (fuchsine tensio-active).

TECHNIQUE.

1° RÉACTIFS. — A. *Solution de fuchsine tensio-active*. — On fait dissoudre 4 g de fuchsine basique cristallisée dans 12 g d'acide phénique à 80° environ en utilisant un bain-marie. On laisse refroidir, puis, lorsque la solution est tiède, on ajoute, en agitant bien, 25 cm³ d'alcool à 95°. On complète à 300 cm³ avec de l'eau distillée. Après filtration, on ajoute le détergent choisi à la dose de X gouttes pour 100 cm³ de solution de fuchsine en prenant soin de bien mélanger après addition de chaque goutte. Cette solution devra être filtrée chaque fois avant l'emploi.

B. *Solutions décolorantes*. — On utilise deux décolorations successives : avec de l'acide nitrique à 5 p. 100 d'une part, puis avec de l'alcool à 90° d'autre part.

C. *Solution colorante de fond*. — On utilise une solution classique de bleu de méthylène phéniqué.

2° TECHNIQUE. — On étale, fixe et colore. Pour ce dernier point, on recouvre la préparation de la solution de fuchsine tensio-active pendant trois minutes. On lave, puis on décolore à l'aide d'acide nitrique (une minute) et ensuite d'alcool (une minute). On lave et on recolore le fond de la préparation par la solution de bleu.

Corps tensio-actifs étudiés. — Jusqu'à présent, tous les corps que nous avons étudiés se sont montrés doués de cette propriété. La dose utilisée a toujours été la même, soit 1 goutte pour 10 cm³ de fuchsine, un excès de corps tensio-actif étant plutôt néfaste.

Nous avons utilisé :

Tween 80 et Tween 20 [détergents non ioniques] ; antarox A-400 (Nomenclature Sisley), série des ammoniums quaternaires [détergents cationiques] ; tétra décyl sulfate de soude, Lavassol, Igepal (Nomenclature Sisley) [détergents anioniques] ; ou des mélanges industriels divers, tels que « Solilaine » ou « Solivaisselle ».

CONCLUSIONS. — Notre méthode, par sa rapidité d'exécution, par la suppression du chauffage et par l'usage de détergents à bas prix se trouvant facilement sur le marché, apporte, à notre avis, une sérieuse amélioration à la détection des bacilles A. A. R. au laboratoire d'analyses médicales.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. AUBERT. *Canadian J. publ. Health*, 1950, **41**, 31.
- [2] J. DESBORDES. *Ann. Pharm. Franç.*, 1951, **9**, 325.
- [3] J. DESBORDES et Et. FOURNIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 40.
- [4] CHERMOCK et MULLER. *Science*, 1946, **103**, 731.
- [5] J. PARAF et collab. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 514.
- [6] T. G. RANDOLPH et collab. *Am. Rev. Tuberc.*, 1944, **49**, 109.

LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE A BACILLES STREPTOMYCINO-DÉPENDANTS

par J. BRUN, J. VIALIER et J.-C. KALB.

(Laboratoire de Pathologie générale et expérimentale
de la Faculté de Médecine [Prof. A. JOSSE] et
et Institut Bactériologique, Lyon.)

La virulence pour le cobaye des bacilles tuberculeux streptomycino-dépendants a été étudiée par un certain nombre d'auteurs. Lenert et Hobby [1], Yegian et Vanderlinde [2] n'ont pas réussi à provoquer de tuberculose expérimentale chez le cobaye en lui inoculant une souche de bacilles streptomycino-dépendants. Doane et Bogen [3] ont pu longuement étudier une souche de bacilles dépendants qui a conservé cette propriété au cours de repiquages ultérieurs. Cette souche qui avait été isolée de l'expectoration d'un malade traité par la streptomycine fut inoculée par voie sous-cutanée à 12 cobayes. La moitié servit de témoins, les autres reçurent une injection journalière de

100 mg de streptomycine durant deux mois. Aucun de ces 12 animaux, traités ou non, ne se tuberculisa. Par contre, une souche mutante dérivée de la souche primitive par repiquage en milieu non streptomyciné se serait montrée pathogène pour le cobaye. Coletsos [4] explique cette perte de virulence par une sénescence et une dégénérescence rapide des souches streptomycino-dépendantes, dues au développement accéléré et anormal du bacille tuberculeux sous l'influence d'un facteur de croissance inhabituel.

A l'opposé, F. Tison [5] signale avoir tuberculisé des cobayes avec une souche strictement dépendante à 10 μ g et résistant à 50 μ g. La tuberculose expérimentale provoquée par cette souche dépendante fut rapidement aggravée par rapport à celle des animaux témoins, par des injections journalières de streptomycine. Les lésions de type miliaire furent plus extensives et les cobayes traités devinrent rapidement cachectiques.

L'interprétation de ces faits reste délicate, d'autant plus que Steenken et Wolinski [6] ont montré que l'injection de streptomycine aggravait la tuberculose du cobaye inoculé avec des bacilles streptomycino-résistants. F. Tison n'a pas retrouvé, au cours de son expérimentation, une telle aggravation.

Ayant eu l'occasion d'isoler deux souches de bacilles tuberculeux streptomycino-dépendants, nous avons étudié leur pouvoir pathogène pour le cobaye. Dans ces deux cas il ne s'agissait pas de streptomycino-exigence, mais de streptomycino-dépendance relative. Ces deux souches isolées sur milieux streptomycinés à partir de l'expectoration de malades porteurs de lésions pulmonaires poussaient nettement, d'une façon plus rapide et plus abondante sur milieux streptomycinés qu'en milieu témoin. Ce caractère se reproduisit au cours de plusieurs repiquages successifs puis disparut comme il est de règle, la souche restant streptomycino-résistante.

Voici les protocoles expérimentaux des deux expériences :

Expérience 1. — Souche isolée directement de l'expectoration d'un malade en cours de traitement, en milieu de Dubos additionné de 50 μ g de dihydrostreptomycine par millilitre et entretenue régulièrement sur milieu de Youmans contenant 100 mg de dihydrostreptomycine par centimètre cube. Cette souche poussait nettement plus rapidement et plus abondamment en milieu streptomyciné qu'en milieu témoin. Ce caractère persista durant 5 repiquages successifs.

L'inoculation fut pratiquée le 18 janvier 1952 à 8 cobayes, à la dose de 1/10 de mg/kg. Les bacilles inoculés provenaient d'une culture en Youmans contenant 100 μ g par centimètre cube de dihydrostreptomycine (troisième passage), la souche ayant conservé les caractères de streptomycinophilie. Quatre cobayes ont servi de témoins, les 4 autres ont reçu une injection journalière de 20 000 μ g de la même dihydrostreptomycine qui avait servi à traiter le malade et à entretenir la souche.

Lors de l'inoculation, le poids global de chacun des lots était identique.

Deux cobayes sont morts prématurément, un cobaye témoin au sixième jour (autopsie négative) et un cobaye traité au onzième jour (petit ganglion inguinal caséeux).

Le traitement a été poursuivi cinquante-trois jours. Les cobayes ont été pesés régulièrement. Les témoins ont grossi de 400 g et les traités maigri de 90 g.

Les 3 témoins et les 3 traités survivants sont sacrifiés le 13 mars 1952. A l'autopsie tous les cobayes présentent des lésions de tuberculose expérimentale généralisée sans que l'on note des différences appréciables d'une série à l'autre. (Poids moyens des foies : témoins = 29 g, traités = 26 g ; longueur de la rate dans un grand axe ; témoins. = 4,1 cm, traités = 4,3 cm.) On note simplement peut-être des lésions pulmonaires plus accentuées chez les cobayes traités. Ces légères différences sont aisément explicables par les injections répétées des animaux.

Expérience 2. — Souche Gia..., isolée à partir de l'expectoration d'une malade atteinte de tuberculose pulmonaire et traitée par la dihydrostreptomycine. Le titrage de la sensibilité en milieu de Youmans montre qu'il s'agit d'une souche résistante à plus de 50 µg/ml et qui pousse plus rapidement et plus abondamment en milieu streptomyciné qu'en milieu témoin. Le caractère se conserve lors d'un deuxième repiquage de la souche isolée. C'est avec le bacille ayant poussé en Youmans, sérum de cheval, contenant 50 µg de dihydrostreptomycine par centimètre cube que l'on inocule 16 cobayes le 14 novembre 1950, à la dose de 0,1 mg/kg. Huit sont conservés comme témoins, 8 reçoivent chaque jour, en deux injections, 30 000 µg de dihydrostreptomycine. Le traitement fut commencé le lendemain de l'inoculation.

Le 26 décembre, soit le quarante-deuxième jour après l'inoculation, 4 cobayes traités sont morts ainsi que 2 témoins. Les lésions trouvées à l'autopsie, variables selon la date de la mort, étaient entièrement superposables d'une série à l'autre. Les animaux traités survivants au nombre de 4 ont reçu chacun 1,2 g de streptomycine. Ils sont sacrifiés ainsi que les 6 autres témoins survivants. Les lésions observées sont celles de la tuberculose expérimentale classique avec atteinte hépatique et splénique et lésions pulmonaires. On n'observe pas de différences notables entre les animaux témoins et les traités.

Ces deux expériences, en tous points superposables, nous ont donc montré que deux souches streptomycino-philés de bacilles tuberculeux avaient conservé pour l'animal un pouvoir pathogène élevé puisque leur inoculation a déterminé chez le cobaye l'évolution d'une tuberculose expérimentale à marche rapide.

D'autre part, le traitement de certains des cobayes inoculés par la streptomycine ne nous a pas permis de modifier l'évolution de la tuberculose et de l'aggraver par rapport à celle des animaux témoins.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LENERT et HOBBY. *Amer. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 219.
- [2] YEGIAN et VANDERLINDE. *J. Bact.*, 1949, **57**, 169.
- [3] DOANE et BOGEN. *Amer. Rev. Tub.*, 1951, **64**, 192.
- [4] COLETOS. *Rev. de la Tuberculose*, 1951, **45**, 548.
- [5] TISON. *Ces Annales*, 1949, **77**, 767.
- [6] STEENKEN et WOLINSKI. *Amer. Rev. Tub.*, 1948, **58**, 353.

ACTION COMBINÉE *IN VITRO* DE L'I.N.H. ET DE LA STREPTOMYCINE SUR LE BACILLE DE KOCH

par M^{me} M. AITOFF et M^{re} A. SALAS.

(Laboratoires du D^r DEBAT, à Garches.)

Avant de communiquer les résultats de nos expériences, nous voudrions donner une définition de ce qu'il est convenu d'appeler la « synergie ».

Lorsque deux substances chimiques différentes ayant une action antibactérienne se trouvent en présence l'une de l'autre, elles peuvent soit s'annihiler — c'est l'*antagonisme* (exemple : P. A. B. et sulfamides), soit agir indépendamment et exercer chacune sa propre action antibactérienne — c'est l'*action additive* pure et simple, par exemple l'action combinée de 3 ou 4 sulfamides différents, soit enfin exacerber dans le même sens l'action antibactérienne exercée par chacune d'elles : c'est la potentialisation de l'action, soit le vrai sens étymologique du mot grec *synergie* : agir ensemble.

Le biologiste anglais Bigger analyse le phénomène de synergie et d'antagonisme de trois substances antiseptiques, combinées deux par deux à trois antibiotiques donnant 16 mélanges différents. Il arrive à la conclusion que, dans certains cas, l'action qui est synergique jusqu'à une certaine concentration devient antagoniste lorsqu'on la dépasse.

Après cette mise au point sur la question de synergie, nous voudrions communiquer le résultat de nos expériences sur l'action combinée de l'hydrazide isonicotinique et la streptomycine.

Lorsqu'on étudie l'action combinée de deux substances, il est nécessaire tout d'abord de procéder à la détermination de l'action antibactérienne de chacune d'elles pour définir les proportions dans lesquelles il faudra les mélanger.

TABLEAU I. — Action de l'I. N. H. seul sur le B. K.

			9 JOURS	14 JOURS	17 JOURS	20 JOURS
1.	4 cm ³ Dubos à 4 µg I. N. H. . .	1 goutte de culture de 7 jours.	—	—	—	—
2.	— 0,5 µg I. N. H. . .		—	—	—	—
3.	— 0,2 µg I. N. H. . .		—	—	—	—
4.	— 0,1 µg I. N. H. . .		—	—	—	—
5.	— 0,05 µg I. N. H. . .		—	—	—	±
6.	— 0,02 µg I. N. H. . .		+	+	+	+
7.	— 0,01 µg I. N. H. . .		++	+	+	+
8.	— 0		+	+	+	+
9.	— 0		++	+	+	+

Tout comme pour le P. A. S., l'expérimentation a été faite dans le milieu liquide de Dubos. Une série de tubes remplis à 4 cm³ avec des doses décroissantes de chacun des deux produits est ensemencée avec la souche H37RV.

Après dix-sept jours d'étuve l'inhibition s'arrête à 0,05 µg. (Tabl. I.)

TABLEAU II. — Action de la streptomycine sur le B. K.

			9 JOURS	14 JOURS	17 JOURS	20 JOURS
10.	4 cm ³ Dubos à 10 µg Str.	—	—	—	—	—
11.	—	5 µg Str.	—	—	—	—
12.	—	2 µg Str.	—	—	—	—
13.	—	1 µg Str.	—	—	—	—
14.	—	0,5 µg Str.	—	—	—	±
			1 goutte de culture de 7 jours.			
15.	—	0,2 µg Str.	±	+	+	+
16.	—	0,1 µg Str.	+	+	+	+
8.	—	0	±	+	+	+
9.	—	0	±	+	+	+

Après dix-sept jours d'étuve l'inhibition s'arrête à 0,5 µg de streptomycine.

Ceci nous indique la proportion dans laquelle les deux produits doivent être mélangés pour combiner le plus efficacement leur action.

Dix parties de streptomycine sont mélangées à une partie d'hydrazide isonicotinique.

TABLEAU III. — Action combinée de dix parties de streptomycine et une partie d'I. N. H.

				9 JOURS	14 JOURS	17 JOURS	20 JOURS	25 JOURS
17.	4 cm ³ Dubos à 10 µg Str. et 4 µg I. N. H.	—	—	—	—	—	—	—
18.	—	5	—	—	—	—	—	—
19.	—	2	—	—	—	—	—	—
20.	—	1	—	—	—	—	—	—
21.	—	0,5	—	—	—	—	—	—
22.	—	0,2	—	—	—	—	—	—
				1 goutte de culture de 7 jours.				
23.	—	0,1	—	±	+	+	+	+
24.	—	0,05	—	±	+	+	+	+
25.	—	0,02	—	±	+	+	+	+
8.	—	0	—	±	+	+	+	+
9.	—	0	—	±	+	+	+	+

Le dernier tube clair est celui qui contient 0,2 µg de streptomycine et de 0,2 µg d'I. N. H.

Si l'on compare l'action combinée des deux produits avec l'action de chacun des composants qui était respectivement de 0,5 μ g pour la streptomycine et de 0,05 μ g pour l'I. N. H. après le même laps de temps, on voit que l'action combinée est deux fois et demie plus grande que celle des deux produits séparés.

Sommes-nous ici en face d'une action synergique aussi nette que celle que nous avons constatée pour l'action combinée du P. A. S. et de l'I. N. H., ou bien, dans le cas présent, cette action ne peut-elle être considérée que comme simplement additive?

Nous supposons que c'est la seconde action que nous sommes en droit d'admettre.

Toutefois, ce qui est valable pour les deux séries d'expériences, c'est la *stabilisation* obtenue par le mélange des deux substances I. N. H. et P. A. S. et I. N. H. et streptomycine.

Cette stabilisation qui, dans nos expériences, dure pendant un mois est d'autant plus intéressante que les tubes contenant l'I. N. H. seul après quatorze à vingt jours d'étuve ont tendance à pousser à des concentrations de plus en plus fortes. Il en est de même pour la streptomycine. Ce phénomène de stabilisation nous fait supposer que les combinaisons I. N. H.-P. A. S. et I. N. H.-streptomycine arriveront à lutter contre la résistance à l'I. N. H. qui apparaît d'une manière précoce.

EFFET REMARQUABLE, SUR LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE, DE L'ASSOCIATION DE L'IDODOCHLOROXYQUINOLÉINE AVEC UNE DOSE SUBACTIVE DE STREPTOMYCINE

par FERNAND TISON.

(Laboratoire central des Villages Sanatoriums de Haute Altitude,
Praz-Coutant [Haute-Savoie].)

Dans une communication précédente [1, 2] nous avons souligné l'action remarquable de l'iodochloroxyquinoléine (I.C.Q.) sur la tuberculose du cobaye.

Ce corps peu toxique, dont l'action locale avait été remarquée par Chiono Paolo [3] et l'action *in vitro* par J. Born, I. Koczka, S. Maron [4] nous avait donné des résultats assez surprenants.

Les travaux de S. Rochetta [5] nous ont incité à essayer un corps soluble : le sulfate d'orthoxyquinoléine. Dix cobayes tuberculisés étant conservés comme témoins, 10 animaux de même poids ont été traités par 3 cg/kg et par jour. L'autopsie n'a pas mis en évidence une action nette de ce corps.

Par contre, un nouvel essai de l'I.C.Q. a été satisfaisant : 20 animaux ont été inoculés avec 1/10 de milligramme de bacilles humains. Le traitement a été commencé aussitôt à titre préventif chez 10 de ces

animaux qui reçurent 3 cg d'I.C.Q. injectable par kilogramme et par jour. L'autopsie des animaux sacrifiés trois semaines plus tard nous confirma les résultats de la première expérience [1, 2].

Nous avons pensé alors à nous adresser à une association de l'I.C.Q. avec la streptomycine à dose subactive.

Pour que l'expérience soit nette, nous avons inoculé les animaux avec des doses fortes de bacilles, et nous avons laissé évoluer la tuberculose dix-huit jours avant traitement.

Quarante cobayes de même poids reçurent 1 cg de bacilles humains fraîchement isolés. Ils furent inoculés sous la peau de la cuisse gauche. Les animaux furent séparés en quatre groupes de 10.

Premier groupe témoin.

Deuxième groupe recevant par jour, à partir du dix-huitième jour, 2 mg de dihydrostreptomycine matin et soir.

Troisième groupe recevant par jour, à partir du dix-huitième jour, 8 mg d'une émulsion d'I.C.Q.

Quatrième groupe recevant par jour deux injections de 2 mg de streptomycine et une de 8 mg de I.C.Q.

La suspension d'iodochloroxyquinoléine était préparée de la façon suivante :

I.C.Q.	1 g
Eau distillée	40 g
Tween 80	1 goutte.

La dose de Tween 80 reçue à chaque injection était insignifiante et ne permettait pas une action analogue à celle décrite par L. Pollet, M. Gaultier et E. Fournier [6] et J. C. Krantz et coll. [7].

Les autopsies après sacrifice d'un animal de chaque groupe ont été faites les dixième, quinzième, vingt-deuxième, vingt-cinquième, vingt-huitième, trentième, trentième, trentième, quarantième, quarantième jours.

Les planches ci-jointes sont plus éloquentes qu'un long texte.

Etant donné le développement rapide de la maladie dû à une infection massive, les résultats ont été surprenants.

Les cobayes du groupe 4 ont été l'objet d'une telle régression des lésions que l'on pense plus à une synergie qu'à une simple addition des effets de la streptomycine et de I.C.Q.

Il est probable que la thérapeutique humaine pourra tirer profit de ces constatations.

Déjà le traitement local (spéléotomies, pleurésies purulentes) nous a semblé intéressant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. TISON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 241.
- [2] P. E. DAVY et F. TISON. *Bull. Acad. Méd.*, 1^{er} avril 1952.
- [3] CHIONO PAOLO. *Bull. et Mém. Soc. Piemont. Chirurgie*, 1934, **4**, 817.
- [4] J. BORN, I. KOCZKA et S. MARON. *Orv. Hetil.* (Hongr.), 1950, **91**, 878.
- [5] S. ROCHETTA. *Minerva Med.*, Turin, 1951, **63**, 397.
- [6] L. POLLET, M. GAULTIER et E. FOURNIER. *Bull. Soc. Méd. Hyg. Travail*, 1951, **12**, 196.
- [7] J. C. KRANTZ. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1948, **93**, 188.

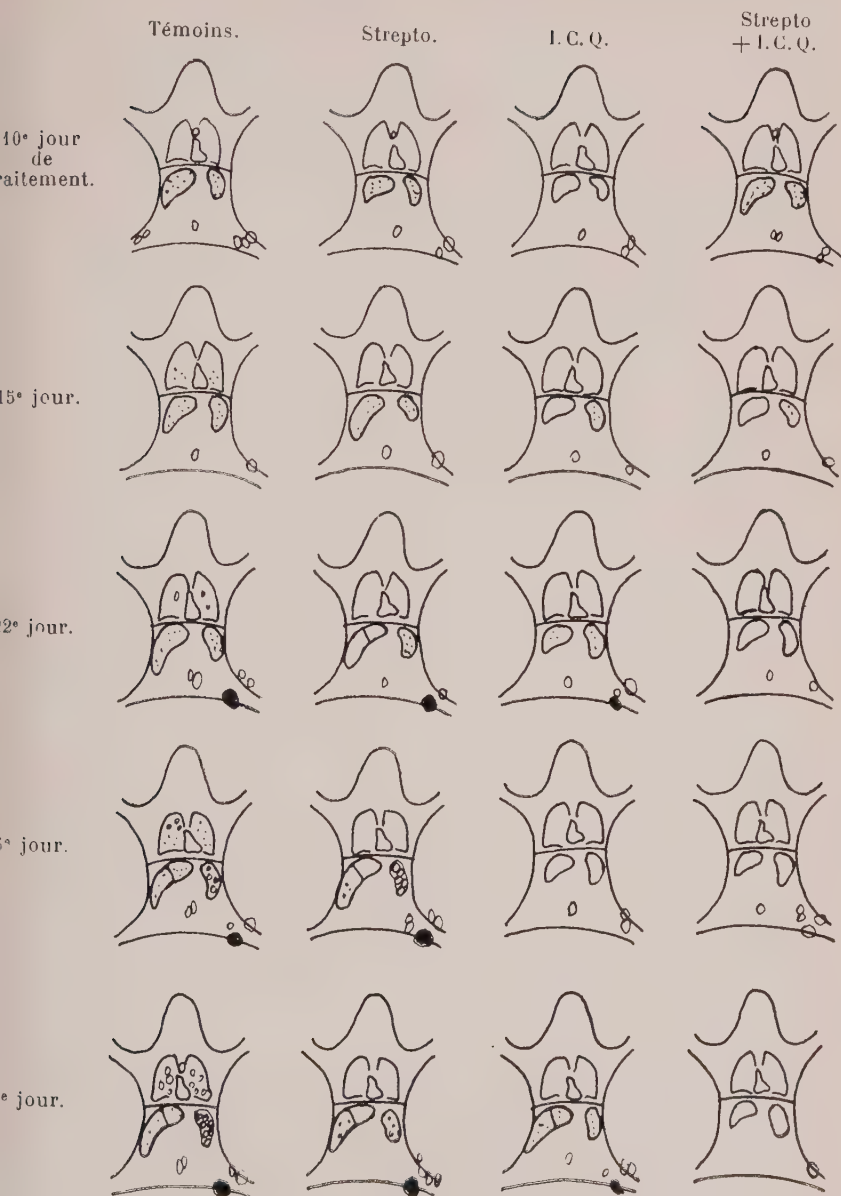


PLANCHE I.

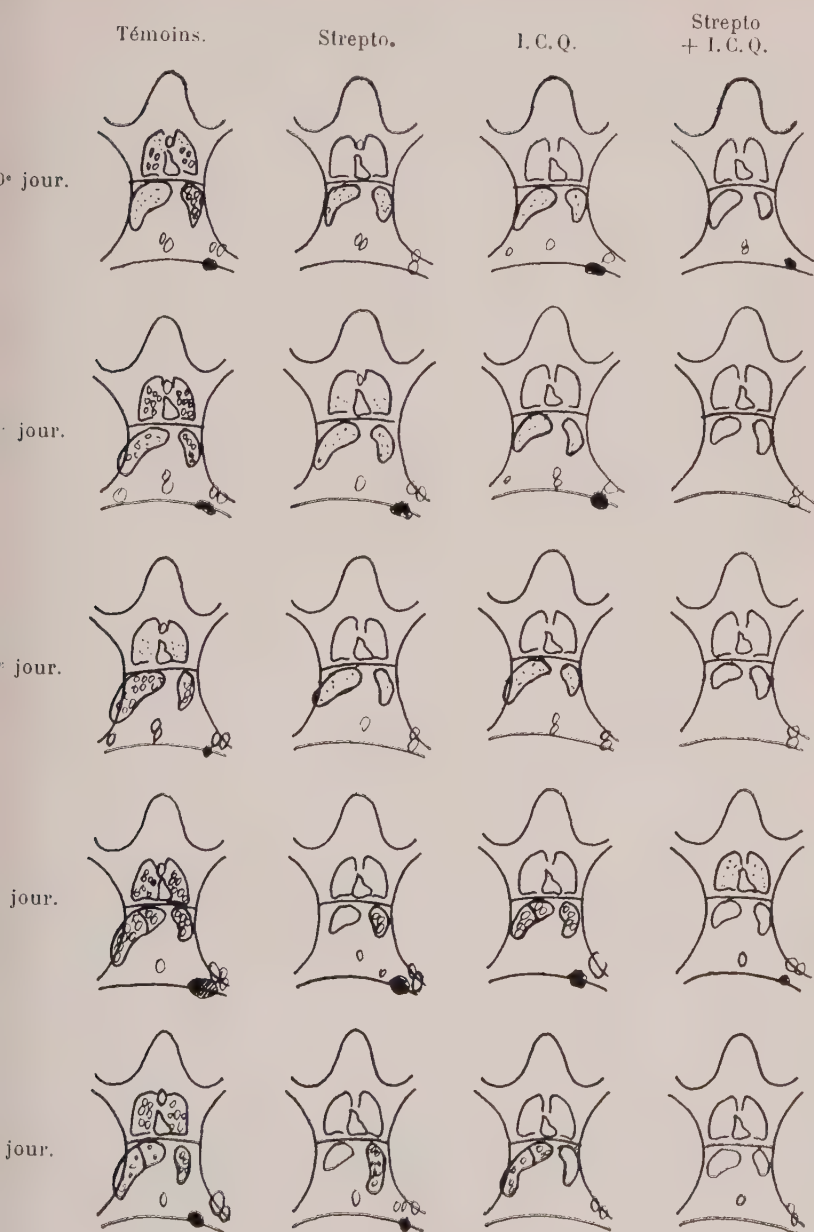


PLANCHE II.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

L'ÉPREUVE DE L'ANNEAU (RING-TEST) POUR LA DÉTECTION DE LA BRUCELLOSE OVINE

par L. CARRÈRE, J. ROUX et H. QUATREFAGES.

(Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine
de Montpellier et Centre OMS/OAA
de Recherches sur la Fièvre ondulante.)

Nous avons récemment étudié l'épreuve de l'anneau sur le lait (Abortus Bang Ring-Probe ou ring-test) au double point de vue de l'épidémiologie et du diagnostic de la brucellose chez les ovins.

Nous rapportons dans cette note les seuls résultats obtenus dans le diagnostic de la maladie, l'ensemble des recherches épidémiologiques faisant l'objet d'une publication en cours (Organisation Mondiale de la Santé).

Depuis la communication de Fleischauer [3] de nombreux travaux, notamment américains et danois, ont porté sur le ring-test. En France, Rossi [4] l'a étudié chez les bovins, et fait ressortir nettement le grand intérêt de ce test dans la recherche épidémiologique, mais sa valeur limitée pour le diagnostic individuel de la maladie. Au C. R. F. O. [2] l'épreuve de l'anneau effectuée chez les chèvres a montré que la réaction, tout au moins avec les antigènes et les techniques actuellement préconisés, ne donnait aucun résultat pratique.

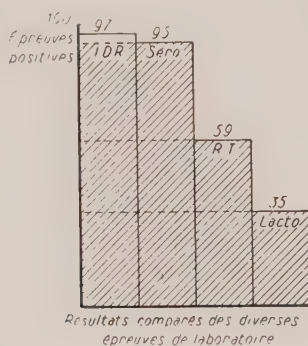
Technique de la réaction. — Le ring-test est une réaction d'agglutination, dans laquelle l'antigène agglutiné est entraîné en surface par montée de la crème du lait. 1 cm³ de lait frais est soigneusement mélangé à 1 goutte d'antigène coloré, dans un tube à hémolyse. Après une à deux heures à 37°, l'apparition d'un anneau coloré à la surface du lait indique une réaction positive. La réaction peut s'effectuer sur le lait fraîchement trait, sur le lait de vingt-quatre heures conservé à la température du laboratoire, ou sur un lait conservé plusieurs jours soit au frigidaire, soit par adjonction d'eau oxygénée. Il faut prendre soin, si le lait a été recueilli depuis quelque temps, d'agiter fortement pour bien homogénéiser. L'antigène est une suspension de *Brucella* colorées par une technique particulière. Plusieurs procédés ont été proposés : nous le préparons à partir d'une souche de *Br. suis* smooth, selon la technique de Bendtsen [1] dans laquelle le colorant utilisé est le chlorure de 2,3,5, triphényltétrazolum qui colore les *Brucella* en rouge cerise.

Lorsque la réaction doit se faire dans la bergerie même, au cours d'une enquête épidémiologique, nous utilisons une étuve portative simple et légère, en bois, chauffée par une bouillotte au mélange eau-acétate de soude. Le délai optimum de lecture nous paraît être de deux heures, certaines réactions positives apparaissant d'ailleurs après quarante minutes d'étuve. Une lecture trop tardive, par contre, n'a pas de valeur : après douze heures, même à la température du laboratoire, de nombreux laits de brebis, indemnes de brucellose, présentent un anneau coloré en surface.

Un test positif se manifeste par la formation d'un anneau rouge cerise à la surface du lait, tandis que le reste du lait, primitivement coloré de façon homogène, est décoloré. Suivant l'intensité de l'anneau et la décoloration consécutive plus ou moins complète du lait au-dessous, les résultats sont notés + + + +, + + +, + +, +.

En cas de réaction négative, le lait reste coloré en rouge, tandis qu'à la surface se trouve un anneau de crème blanche. Fréquemment, au lieu d'un anneau en surface, on note la présence d'un culot coloré dans le fond du tube, avec éclaircissement de la colonne de lait. Parfois, anneau et culot coexistent. Tous les résultats obtenus permettent d'accorder à ce culot la même valeur qu'à l'anneau.

Etude comparée avec d'autres réactions de diagnostic de la brucellose. — Cette étude a été faite sur les laits individuels de brebis en vue d'une application éventuelle au diagnostic de la maladie. Dans un



troupeau très infecté nous avons pratiqué sur 63 brebis une intradermo-réaction à la mélitine, un séro-diagnostic de Wright, une lacto-agglutination et un ring-test.

L'intradermo-réaction a été faite par injection dans le derme du pli sous-caudal de 0,1 cm³ de mélitine du C. R. F. O. La lecture est faite quarante-huit heures après. Le séro-diagnostic de Wright est effectué avec l'antigène du C. R. F. O. et par la technique habituelle. Chez les brebis une agglutination complète au taux de 1/10 est considérée comme positive. La technique du lacto-séro-diagnostic est celle qui est employée couramment ; obtention du lacto-sérum par coagulation du lait par la présure, dilution en progression géométrique, antigène du C. R. F. O. Une agglutination au taux de 1/10 est positive.

Pour les 65 brebis, les résultats des examens ont été les suivants :

61 intradermo-réactions, 60 séro-diagnostic, 37 ring-tests et 23 lacto-séro-agglutinations ont été positifs. Le graphique ci-joint traduit ces résultats en pourcentage et objective nettement les valeurs comparées de ces différentes épreuves (graphique 1).

CONCLUSIONS. — Bien que portant sur un nombre restreint d'animaux, on peut déduire de nos recherches la confirmation de la supériorité de l'intradermo-réaction et de la séro-agglutination en ce qui

concerne le diagnostic de la maladie. Nous considérons d'ailleurs que l'intradermo-réaction est parfois plus précocement positive que la séro-agglutination (nous en avons un cas dans cette étude). La valeur de la séro-lacto-agglutination, chez les brebis, paraît très restreinte et comparable aux résultats médiocres chez les bovins (Rossi) [5].

Le ring-test s'avère supérieur à la lacto-séro-agglutination par une sensibilité plus grande. Par ailleurs la spécificité de cette réaction a été vérifiée sur de nombreux autres animaux : nous n'avons jamais rencontré de ring-test positif chez des brebis saines. Cependant les résultats donnés par le ring-test sont inférieurs à ceux du séro-diagnostic et de l'intradermo-réaction. Il est trop souvent négatif chez des animaux brucellisés pour être de quelque valeur quant au diagnostic de la maladie.

Par contre, il convient de souligner à cette occasion l'intérêt très réel du ring-test dans le dépistage de la brucellose ovine au cours des recherches épidémiologiques, comme a été soulignée sa valeur dans la détection de la brucellose bovine par Rossi [4]. Récemment, au cours d'une enquête épidémiologique portant sur 134 troupeaux (8 600 brebis), nous avons pu en marquer le bien-fondé dans les résultats que nous rapportons par ailleurs (*Bull. Org. Mond. Santé*). La spécificité de la réaction, sa simplicité qui permet sa réalisation à la bergerie même, sa portée, lorsqu'elle est exécutée sur les laits de grand mélange, font du ring-test la réaction par excellence dans les grandes enquêtes de dépistage, systématique, rapide, des foyers régionaux de brucellose ovine.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] H. BENDTSEN. *Nord. Vet. Med.*, 1949, **1**, 915 ; *Org. Mond. Santé : Bull. Information sur la Brucellose*, 1950, n° 3.
- [2] L. CARRÈRE et G. RENOUX. *Org. Mond. Santé : Bull. Information sur la Brucellose*, 1950, n° 16.
- [3] FLEISCHAUER. *Berl. tierärztl. Wochenschr.*, 1937, **53**, 527.
- [4] P. ROSSI et Y. DUTILLOY. *Bull. Acad. vétér. France*, 1951, **24**, n° 9, 485 ; *Bull. Acad. vétér. France*, 1951, **24**, n° 10, 525.
- [5] P. ROSSI. *Bull. Soc. vétér. Lyon*, 1948, **50**, 181.

LES ACIDES HUMIQUES DANS LA PRÉPARATION DE MILIEUX POUR L'ÉTUDE ÉCOLOGIQUE DE LA MICROFLORE DES SOLS ACIDES

par H. DE BARJAC.

(*Institut Pasteur. Service de Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du sol.*)

L'un des principes de la Microbiologie des sols est d'employer des techniques se rapprochant au maximum des conditions écologiques [1]. Il n'est donc pas rationnel d'examiner la microflore caractéristique des

terrains acides sur des milieux de culture à pH = 7. D'autre part, l'acidification des milieux par addition de tampons ou d'acides minéraux tels que PO_4H_3 reste fort éloignée des conditions d'acidification dans le sol.

L'emploi d'acides organiques serait *a priori* plus satisfaisant s'il ne réalisait en même temps un apport d'aliment énergétique capable de favoriser spécifiquement tel groupe physiologique, aux dépens de tel autre.

L'acidité des sols n'est pas due à la présence d'acides solubles, mais au degré de non-saturation du complexe colloïdal argilo-humique, soit à la concentration en ions H^+ fixés à la surface dissociée des micelles acidoïdes de ce complexe [2]. La prépondérance du rôle joué par les colloïdes humiques dans la réaction des sols nous a donc conduit à envisager leur utilisation pour ajuster des milieux de cultures acides, en nous maintenant le plus près possible des conditions naturelles.

L'extraction des acides humiques a été réalisée par la technique suivante indiquée par Pichard [3].

Mode d'obtention des acides humiques. — 2 kg de terreau sont soumis à l'épuisement par 4 l d'ammoniaque en solution à 2 p. 100, en présence de chlorure de potassium à 0,2 p. 100 pour coaguler l'argile. L'épuisement est réalisé à l'abri de l'air (solution ammoniacale préparée avec de l'eau distillée bouillie, flacon d'extraction complètement rempli de liquide et soigneusement bouché), ce qui est indispensable pour empêcher l'oxydation de la lignine. Après douze heures de contact à froid, on porte douze heures à 60° en agitant à plusieurs reprises. Le liquide brun surnageant est filtré et le filtrat précipité par l'acide chlorhydrique jusqu'à obtention de pH = 2, point où l'on n'observe plus de précipitation. Le précipité est séparé par centrifugation puis soumis à différents lavages avec une solution de ClH à 2 p. 1 000, puis de l'eau acidifiée par quelques gouttes de ClH , puis enfin de l'eau distillée (trois à quatre fois). Le précipité lavé est alors remis en suspension dans l'eau distillée, et peut être purifié par redissolutions et précipitations successives. On obtient ainsi une suspension homogène et stable d'acides humiques dont le pH est de

	GÉLOSE extrait de terre 15 p. 100	EXTRAIT de terre	EXTRAIT de terre Eau de Seine à à	SOLUTION de Winogradsky au 1/20
pH tel quel.	5	8,1	8	7,5
pH après addition de la suspension à une concentration p. 100 de :				
5 p. 100	5,5			
10 p. 100	4,5	6,4	6,4	6,2
17 p. 100	3,3	5,6	5,3	5
23 p. 100		5,1	4,5	4,3
28 p. 100		4,3		

2,5 et l'extrait sec est de 4,4 g par litre (dans les conditions de concentration où nous nous sommes placé).

Réalisation d'une gamme de pH acides en différents milieux. — Cette même suspension d'acides humiques ajoutée à diverses concentrations aux milieux usuels suivants nous a permis d'obtenir des pH échelonnés de 6,4 à 3,3.

CONCLUSION. — L'addition d'acides humiques aux milieux de culture pour l'étude des microbes de sols acides permet de réaliser des conditions de développement très proches des conditions écologiques : degré de pH acide très nuancé en fonction de la concentration, nature même des colloïdes réglant ce pH. Ils auraient de plus l'avantage, même dans ces milieux stérilisés par la chaleur, d'agir comme facteurs de croissance, l'emploi d'humates ayant déjà été conseillé pour stimuler le développement des cultures de microbes du sol [4].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. WINOGRADSKY. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1947, **12**, 5.
- [2] A. DEMOLON. *Dynamique du Sol*, 1948, **1**, 288.
- [3] G. PICHARD. *Ann. Agron.*, 1931, **4**, 505.
- [4] H. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1950, **79**, 354.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Recherches immunochimiques sur « *Vibrio foetus* ». I. Etude sérologique préliminaire de dix souches d'origines diverses.
II. Fractionnement chimique des corps microbiens et étude sérologique de deux fractions antigéniques, par J. GALLUT.

Essai de dosage des antigènes somatiques au sein de « *S. typhi* ». II. Dosage de l'antigène O dans les microbes de nombreuses souches typhiques, par M^{lle} A. M. STAUB et R. COMBES.

Etude cytologique de la lyse d'un « *Escherichia coli* » colicinogène, par M^{lle} B. DELAPORTE.

Calcul du point 50 p. 100 de Reed et Muench en fonction du temps de survie mesuré dans une cage enregistreuse, par R. DEVIGNAT.

LIVRE REÇU

A. Piney. — *A clinical Atlas of Blood Diseases*, 7^e édit., 1 vol., 136 p., 48 fig. dont 45 en couleurs. J. et A. Churchill, Londres. Prix : 21 sh.

Il s'agit de la 7^e édition de cet Atlas, dont la première avait paru en 1930. Comme le rappelle l'auteur dans la préface, l'hématologie a fait des progrès considérables au cours de ces vingt dernières années, et la présente édition s'est efforcée de présenter d'une façon condensée les aspects actuels, cliniques, hématologiques et pathologiques de la question. Il s'agit d'un manuel qui sera précieux tant aux spécialistes qu'aux praticiens. Les planches en couleurs ont été l'objet de soins tout particuliers et un glossaire en fin d'ouvrage permet de se reporter facilement au sujet désiré.

H. T.

CONGRES D'HYGIENE

Le XXXII^e Congrès d'Hygiène, organisé par la Société de Médecine Publique et de Génie Sanitaire, aura lieu au grand amphithéâtre de l'Institut Pasteur, les 27, 28 et 29 octobre 1952, sous la présidence du D^r Leclainche, directeur général de l'Assistance Publique de Paris.

Les sujets mis à l'ordre du jour du Congrès sont les suivants :

- Epidémiologie des Leptospiroses.
- Le rhumatisme, maladie sociale. Organisation de la lutte contre le rhumatisme. Principes et réalisations.
- Evolution des problèmes hospitaliers en France et à l'étranger.

Les auteurs qui désireraient présenter des communications sur ces sujets sont priés d'en adresser le texte en triple exemplaire ainsi qu'un résumé en 30 exemplaires au Secrétariat Général du Congrès, D^r Petit-Maire, 1, rue de Tilsitt, Paris (8^e), avant le 15 septembre.

Les demandes d'inscription au Congrès doivent également être adressées au Secrétariat général qui adressera aux intéressés tous les renseignements utiles.

Le Gérant : G. MASSON.

LIVRE REÇU

A. Piney. — *A clinical Atlas of Blood Diseases*, 7^e édit., 1 vol., 136 p., 48 fig. dont 45 en couleurs. J. et A. Churchill, Londres. Prix : 21 sh.

Il s'agit de la 7^e édition de cet Atlas, dont la première avait paru en 1930. Comme le rappelle l'auteur dans la préface, l'hématologie a fait des progrès considérables au cours de ces vingt dernières années, et la présente édition s'est efforcée de présenter d'une façon condensée les aspects actuels, cliniques, hématologiques et pathologiques de la question. Il s'agit d'un manuel qui sera précieux tant aux spécialistes qu'aux praticiens. Les planches en couleurs ont été l'objet de soins tout particuliers et un glossaire en fin d'ouvrage permet de se reporter facilement au sujet désiré.

H. T.

CONGRES D'HYGIENE

Le XXXII^e Congrès d'Hygiène, organisé par la Société de Médecine Publique et de Génie Sanitaire, aura lieu au grand amphithéâtre de l'Institut Pasteur, les 27, 28 et 29 octobre 1952, sous la présidence du D^r Leclainche, directeur général de l'Assistance Publique de Paris.

Les sujets mis à l'ordre du jour du Congrès sont les suivants :

- Epidémiologie des Leptospiroses.
- Le rhumatisme, maladie sociale. Organisation de la lutte contre le rhumatisme. Principes et réalisations.
- Evolution des problèmes hospitaliers en France et à l'étranger.

Les auteurs qui désireraient présenter des communications sur ces sujets sont priés d'en adresser le texte en triple exemplaire ainsi qu'un résumé en 30 exemplaires au Secrétariat Général du Congrès, D^r Petit-Maire, 1, rue de Tilsitt, Paris (8^e), avant le 15 septembre.

Les demandes d'inscription au Congrès doivent également être adressées au Secrétariat général qui adressera aux intéressés tous les renseignements utiles.

Le Gérant : G. MASSON.